N° d'Ordre 326

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Françoise CASTAGNOU

Licenciée ès Sciences

Sur la dégradation bactérienne des pénicillines: rôle de la pénicillamine dans l'effet antibiotique

Soutenue le 6 Juillet 1971 devant la Commission d'Examen

MM.	J. **SÉCHET**, Professeur	PRÉSIDENT
	J. **EYMÉ**, Professeur	EXAMINATEURS
	J. **VINDT**, Professeur, Directeur de l'Unité de Biologie	
	Ch. **DULONG de ROSNAY**, Professeur à l'Université de Bordeaux II	
	J. **LATRILLE**, Docteur ès Sciences Naturelles	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543508_0024

N° d'Ordre 326

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Françoise CASTAGNOU

Licenciée ès Sciences

Sur la dégradation bactérienne des pénicillines: rôle de la pénicillamine dans l'effet antibiotique

Soutenue le 6 Juillet 1971 devant la Commission d'Examen

MM. **J. SÉCHET**, Professeur . . . . . PRÉSIDENT

J. EYMÉ, Professeur . . . . . }

J. VINDT, Professeur, Directeur de l'Unité de Biologie . . . . } EXAMINATEURS

Ch. DULONG de ROSNAY, Professeur à l'Université de Bordeaux II }

J. LATRILLE, Docteur ès Sciences Naturelles . . . . . }

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

C'est à toi DENISE

que je dédie ces heures de travail.

A MON PERE

A MA MERE

A MA SOEUR

en témoignage de ma profonde affection.

I N T R O D U C T I O N

On admet actuellement que l'activité antibiotique de la pénicilline est due à un blocage de la synthèse de la paroi. Ceci entraînerait la formation de sphéroplastes qui précèderait obligatoirement l'effet antibiotique.

Dans une série de travaux entrepris sous la direction du Professeur DULONG de ROSNAY, le rapport entre effet antibiotique et effet inducteur de sphéroplastes pénicilline a été étudié et exposé dans la thèse de Sciences du Docteur J. LATRILLE. Ce dernier a observé que l'acide 6 amino pénicillanique (6 APA) qui est le noyau commun de toutes les pénicillines et qui possède la fonction βlactamase fortement énergétique est plus un inducteur de sphéroplastes qu'un antibiotique proprement dit.

Au cours de ses recherches, LATRILLE a observé incidemment que, d'une part, l'hydrolyse bactérienne de la pénicilline G aboutissait à la production de pénicillamine et que, d'autre part, l'hydrolyse bactérienne du 6 APA ne donnait pas de pénicillamine. Il a noté en outre que l'activité antibiotique du 6 APA était potentialisée par la pénicillamine. Nous avons alors rapproché tous ces résultats et nous nous sommes demandée s'il y avait un rapport entre activité antibiotique, activité inductrice et production de pénicillamine. Tout notre travail a été centré sur la molécule de pénicillamine, sa production par diverses souches et son activité inductrice, car c'est une molécule très intéressante par le nombre de ses fonctions réactives et par son fort pouvoir chélateur.

Nous avons étudié la production de pénicillamine en fonction de la nature des milieux de culture, de la nature de la chaîne latérale des pénicillines, puisque cette dernière est indispensable, et des caractères enzymatiques des souches. Les conditions, le temps et le site de formation du métabolite ont été déterminés ainsi que sa

fréquence d'apparition. La pénicillamine étant capable d'induire des sphéroplastes, nous avons été amenée à étudier ensuite l'action de ce métabolite sur la teneur des germes en cations divalents comparativement à celle de l'EDTA. Ceci nous a conduit à formuler quelques hypothèses sur l'action de la pénicilline qui paraît très complexe et ne peut se résumer à la simple inhibition de la synthèse de la paroi.

*
* *

Au temps lointain où les thèses s'écrivaient en latin, seul le père recevait l'hommage public du travail de son enfant. Me permet-on de regretter que cette étude n'ait pu prendre une orientation plus pharmaceutique pour que mon père en soit le conseiller et le juge.

C'est Monsieur le Professeur SECHET qui a bien voulu continuer à s'intéresser au problème des sphéroplastes pénicilline. Malgré ses multiples activités de recherche et d'enseignement, nous avons toujours trouvé auprès de lui toute l'aide et les conseils judicieux que nous pouvions souhaiter. Son accueil a toujours été bienveillant, même si nous venions lui présenter une somme de résultats, le plus souvent disparates, accumulés au cours des jours. Nous tenons à lui exprimer notre vive et respectueuse gratitude d'avoir accepté de présider notre thèse et l'assurons de notre profond attachement.

Nous voulons témoigner notre sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur EYME et Monsieur le Professeur VINDT d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Toute l'expérimentation a été effectuée au laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine. Il y aura bientôt sept ans que Monsieur le Professeur MOUSTARDIER nous a accueillie. Qu'il nous soit permis de lui exprimer ici nos plus vifs remerciements pour sa bienveillance à notre égard et de l'assurer de notre profonde et respectueuse gratitude.

C'est Monsieur le Professeur DULONG de ROSNAY qui a bien voulu inspirer, guider et parfaire ce travail tout au long de sa réalisation. Nous lui sommes reconnaissante d'avoir su nous communiquer l'enthousiasme qu'il manifeste dans ses travaux de recherche. Son esprit critique et sa rigueur scientifique alliés à l'étendue de ses connaissances en font le guide le plus sûr. Que ce travail réalisé sous sa direction soit le témoignage de notre attachement et de notre profonde admiration.

Les brillantes qualités intellectuelles du Docteur J. LATRILLE, son dynamisme et son autorité scientifique ont été à l'origine de notre vocation de bactériologiste. Il a toujours su nous entourer de ses conseils avertis et de sa bienveillante amitié. Nous sommes très sensible à l'honneur qu'il nous fait en acceptant de nous juger.

L'étude des sphéroplastes pénicillamine en microscopie électronique a été réalisée grâce à la participation de Monsieur M. MERCIER, assistant du Professeur CAMBAR. Qu'il en soit vivement remercié. Nos remerciements vont aussi au Docteur SABY, des Laboratoires BRISTOL, qui nous a fourni à chaque demande de l'acide 6 aminopénicillanique et de la pénicillamine, et au Docteur J.M.T. HAMILTON MILLER qui nous a adressé la souche *Klebsiella aerogenes* 418.

Notre gratitude s'adresse enfin à tous ceux qui ont participé à la réalisation technique de l'expérimentation, et en particulier à tout le personnel du Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine. Je tiens à remercier plus spécialement Madame DEMARQUEZ et Madame DROUET qui, par leur grande gentillesse, leur compétence et leur dévouement ont su me simplifier le travail avec efficacité. Que Madame FARGE trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour la tâche fastidieuse qu'elle a réalisée avec beaucoup d'amabilité. Enfin que Monsieur J. BARRERE soit remercié pour la patience avec laquelle il a réalisé les courbes et les photos de cet ouvrage.

*

HISTORIQUE

LES NOMBREUX EFFETS DE LA PENICILLINE SUR LE METABOLISME MICROBIEN

Depuis 1929, date de la découverte de la pénicilline par FLEMING, nombreux sont les auteurs qui se consacrèrent à l'étude du mécanisme d'action de cet antibiotique.

Il a été cru longtemps que la pénicilline se comportait comme une enzyme et non comme un antimétabolite, car elle ne semblait ni absorbée, ni détruite par les bactéries (107 - 130). En utilisant une culture de *Staphylococcus aureus*, PASYNSKI et KATORSKAYA (174) en 1947, soupçonnèrent les premiers la fixation de la pénicilline sur le matériel cellulaire. Cette hypothèse fut confirmée en 1949 par ROWLANDS et ROWLEY (196)(198) SATO(204) qui,utilisant de la pénicilline radioactive marquée sur le S (38), estimèrent cette fixation à 10 moles d'antibiotique par germe. Dans le cas du staphylocoque tout au moins, cette fixation serait de deux sortes : d'une part non spécifique, par diffusion à travers la membrane cellulaire et d'autre part spécifique et indépendante de la concentration extracellulaire. Elle serait rapide, décrite uniquement chez les organismes sensibles (172), solide et irréversible (60). Cette liaison ne peut, en effet, être rompue ni par lavage avec des tampons neutres, ou des acides, ou des détergents, ni par déplacement avec des solutions de pénicilline non radio-active (37) (142) (119). Une solution alcaline diluée libère seulement la pénicilline sous forme d'acide pénicilloïque, ce qui suggère l'existence d'une liaison covalente et probablement d'une liaison ester.

Pour localiser la fixation de la pénicilline radioactive, COOPER, ROWLEY et DAWSON (36) (40) ont eu recours au broyage des germes pour séparer paroi bactérienne et cytoplasme. Chez les staphylocoques, la pénicilline est liée à un composant de la membrane cytoplasmique (207) et ce composant pourrait être la mureine peptidase, enzyme qui serait inhibée par la pénicilline (193) (262). Nous reviendrons ultérieurement sur cette action.

Les céphalosporines et les pénicillines semi-synthétiques ont un mode de fixation identique. EDWARDS et PARKE (65) ont déterminé le rapport qui existe entre l'activité de l'antibiotique et sa vitesse de

fixation sur *Staphylococcus aureus*, rapport mesuré par compétition de fixation sur les récepteurs entre la pénicilline étudiée et la benzyl pénicilline marquée avec du ^{14}C.

Finalement, il semble que les organismes sensibles possèdent des sites récepteurs ayant une forte affinité pour l'antibiotique (197) (38), et que la concentration de pénicilline nécessaire pour inhiber la pousse est exactement celle qui sature les sites récepteurs dans un temps de génération inférieur à 1 (143) (39). La multiplication des bactéries augmente le nombre des récepteurs, elle entraîne donc une plus grande sensibilité du germe à l'antibiotique. Cette hypothèse est vérifiée par la pratique (39) car la pénicilline n'est active que sur des bactéries en voie de prolifération (131), son maximum d'efficacité se situant pendant la période de croissance logarithmique (162). De plus, la dose optimum varie entre 2 et 10 fois le seuil de sensibilité du germe à la pénicilline, dose au-dessus de laquelle l'effet antibiotique est parfois moindre (59). Mesurée au biophotomètre, l'action de la pénicilline se fait en trois temps : multiplication initiale des germes (152), lyse progressive de ceux-ci et clarification du milieu. La destruction n'est souvent pas totale, la bactériostase a une durée variable, puis la culture reprend. La raison pour laquelle la croissance est nécessaire pour tuer les germes est obscure et ne se limite pas à la fixation de l'antibiotique sur les récepteurs puisque la pénicilline se fixe aussi bien sur des germes au repos, que sur des germes en croissance active.

L'activité de l'antibiotique sur la multiplication microbienne a été expliquée par l'inhibition de l'équipement enzymatique nécessaire à la division cellulaire (168), ce qui provoquerait l'arrêt brutal de la pousse, mais respecterait la vitalité cellulaire. Selon NICKERSON et CAVALLITO (161) (32), les enzymes responsables des bipartitions sont des enzymes ayant des groupements actifs -SH avec lesquelles la pénicilline doit interférer, puisque la cystéine inhibe son action et protège la multiplication bactérienne. Cette hypothèse, dont le mécanisme a été fortement discuté, est admise par de nombreux auteurs comme PULVERTAFT (184) et DUBOS (52) qui expliquent ainsi l'apparition de formes géantes dans les cultures traitées par la pénicilline.

C'est en 1945 que DUGUID (54) a décrit chez des germes ainsi traités, l'apparition de formes bactériennes anormales (108), ces formes pouvant être filamenteuses (*Pseudomonas*) ou sphériques (*Escherichia coli*). La pénicilline provoque un retard très accentué de la division cytoplasmique sur la division nucléaire provoquant une augmentation sur place du matériel nucléaire et entraînant de nombreux troubles métaboliques. La pénicilline ne doit pas affecter qu'un seul processus catabolique, puisqu'elle peut agir par simple bactériostase avec maintien du potentiel respiratoire et augmentation du volume des persisters ou par lyse des microorganismes.

A. ACTION CYTOCHIMIQUE DE LA PENICILLINE.

Elle est de plusieurs ordres. Les sels de pénicilline sont des composés colloïdaux, qui donnent des solutions présentant l'effet Tyndall. Les études optiques, électrophorétiques et conductimétriques montrent que la pénicilline forme des micelles chargées négativement, que les sels de pénicilline abaissent nettement la tension superficielle microbienne, et que les cations multivalents affectent le nombre de particules vues à l'ultramicroscope.

LEVADITI et ses collaborateurs (134) (135) utilisant la méthode d'imprégnation argentique de FONTANA TRIBONDEAU montrent que la pénicilline agit sur la membrane limitante en supprimant l'argyrophilie; ceci prouverait que le NO_3 Ag n'est plus réduit en Ag^0 donc que le potentiel d'oxydo réduction serait perturbé.

Le cytoplasme perd la propriété de fixer uniformément les colorants basiques, mais récupère ses propriétés tinctoriales en présence de pénicillinase.

En 1947, DUFRENOY et PRATT (53) ont mesuré les taux d'oxydo-réduction obtenus dans les milieux de culture en présence de diverses concentrations de pénicilline. Toutes les techniques employées montrent que les zones d'inhibition sont caractérisées par des taux relativement élevés du rH par rapport aux zones non inhibées. Ces auteurs démontrent l'existence d'un seuil et estiment que les résultats obtenus reflètent les concentrations relatives des groupes -SH et -S-S-. La concentration bactériostatique ou bactéricide de la pénicilline est celle qui provoque la déshydrogénation 2 - SH en -S-S- plus rapidement que la réaction inverse, ce qui entraînerait une modification de la respiration aérobie. Les concentrations sub-inhibitrices agiraient comme des facteurs de croissance favorisant la réhydrogénation. Les concentrations très élevées diminueraient l'activité des accepteurs d'hydrogène. Si cette hypothèse est valable, le transfert de l'hydrogène doit être perturbé. Les réactions de mise en évidence des aldéhydes et des phosphatases alcalines et le système cytochrome - cytochrome-oxydase, sont en effet perturbés, sinon inhibés par des concentrations bactériostatiques et activés par des concentrations sub-bactériostatiques. Le pH est fortement abaissé, la fonction aldéhyde est oxydée en fonction cétonique, puis acide. Le potentiel d'oxydo-réduction est donc devenu incompatible avec la respiration.

Ces mêmes auteurs (181) ont aussi remarqué que l'addition de traces de Co à des concentrations non bactériostatiques, abaisse très fortement la C.M.I. de la pénicilline. Ils admettent que l'efficacité du Co serait due à la formation de complexes avec les groupements -SH protidiques (284). Mais ce serait le seul métal ayant une activité synergique, or ce n'est pas le seul métal chélate par la fonction sulfhydryle.

B. ACTION DE LA PENICILLINE SUR LES METABOLISMES MICROBIENS.

Dès 1956 COOPER (37) avait suggéré que de nombreux effets de la pénicilline devaient être consécutifs à une modification de la perméabilité bactérienne.

Depuis, il a été confirmé par MONTGOMERIE et coll. (154) que la pénicilline perturbe fortement les échanges du Na^+ et du K^+. Selon les auteurs, il y aurait accumulation du Na^+ à l'intérieur de la bactérie et perte du K^+. Or les échanges de ces deux cations sont étroitement liés au mécanisme énergétique propre à toutes les membranes et ils sont indispensables aux transferts moléculaires (41).

Le métabolisme des cations bivalents comme celui du Mg^{++} est aussi fortement perturbé par l'antibiotique (37).

D'autre part PRESTIDGE et PARDEE (182) ont montré que certains composants intracellulaires diffusaient dans le milieu après addition de pénicilline, preuve formelle d'une modification de la perméabilité cellulaire. Des protéines absorbant à 260 m μ sont identifiables dans le milieu de culture, et après 10 minutes de contact seulement, l'activité de la β galactosidase d'*Escherichia coli* est fortement diminuée. Si le temps de contact est prolongé, de plus grosses molécules peuvent traverser la paroi bactérienne, sans que pour cela le germe perde tous ses constituants.

MACHEBOEUF, GROS et leurs collaborateurs ont entrepris une vaste étude de l'action des antibiotiques sur le métabolisme glucidique, protéique et nucléo-protéique. Ces auteurs pensaient que la pénicilline, n'étant antibiotique qu'après fixation sur le germe, pouvait bloquer une enzyme ou tout effecteur indispensable à une réaction enzymatique (145).

L'étude de différents processus enzymatiques (PARK), montre qu'après 30 minutes d'exposition à l'antibiotique, de très nombreux métabolismes sont respectés (172). La respiration (33) et les synthèses des ADN et des protéines ne sont pas modifiées. La synthèse de l'A.R.N. est seulement diminuée. La synthèse du muco-complexe de PARK (171) est la seule à être réellement et immédiatement inhibée. Si le temps de contact est plus important, tous les métabolismes sont perturbés.

1. ACTION SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE.

Utilisant *Clostridium sporogenes*, SCHULER (211) et GALE (78) ont montré que la pénicilline ne perturbe pas la fermentation du glucose. Poursuivant l'étude du phénomène, GROS et MACHEBOEUF ont pu démontrer que toutes les étapes du métabolisme phosphopyruvique étaient respectées. Utilisant *Escherichia coli* et du glucose marqué sur le ^{14}C, TRUCCO et PARDEE (244) n'enregistrèrent aucune modification importante d'incorporation de ce sucre dans la paroi.

Pourtant en 1962, ROGERS et MANDELSTAM (146), mesurant la radio activité de l'acide diaminopimélique après précipitation par l'acide trichloracétique, ont démontré que les entérobactéries et les staphylocoques ne pouvaient fixer que 70 pour cent de glucose sur l'acide diaminopimélique. Les auteurs précédents avaient pratiqué leur expérience sur le cell wall entier des germes et non uniquement sur le mucocomplexe de Park.

2. ACTION SUR LE METABOLISME DU PHOSPHORE MINERAL (64).

La pénicilline n'aurait pas d'influence sensible sur la diffusion des ions phosphoriques des corps microbiens dans le bouillon, mais au contraire augmenterait fortement la demande des germes en ion phosphate. Elle pourrait donc inhiber au moins une combinaison phosphorique. Utilisant *Clostridium sporogenes*, MACHEBOEUF a montré que la pénicilline perturbe le catabolisme de l'A.T.P. (93). Il pourrait y avoir interférence entre la pénicilline et l'acide nucléique (93).

3. ACTION SUR LE METABOLISME PROTIDIQUE.

Des staphylocoques lavés, respirant dans une solution contenant du glucose, des sels minéraux, un mélange d'amino acides, utilisent tous les amino acides et synthétisent des protéines cellulaires (77). Dans les mêmes conditions, en présence de pénicilline, la consommation des différents éléments du milieu est identique, mais il n'y a pas synthèse de protéines cellulaires, il y a seulement production croissante de substances azotées extra-cellulaires.

Plus particulièrement, le métabolisme de l'acide glutamique est fortement perturbé par l'action de la pénicilline. Il est admis que l'assimilation de l'acide glutamique par les germes nécessite au préalable certaines liaisons peptidiques extra-cellulaires. En présence de pénicilline, la bactérie semble demeurer imperméable à ces peptides bien qu'elle laisse pénétrer ceux à base de valine. En fait, la pénicilline empêche certaines réactions de transpeptidation et en particulier celles qui font intervenir l'acide glutamique. Les travaux de HANS, HIRD et ISHERWOOD (101) ont montré que la pénicilline inhibe les réactions de transpeptidation qui font intervenir le glutathion comme co-enzyme (79). La pénicilline, vu sa ressemblance stérique,pourrait être antimétabolite vis-à-vis du glutathion.

Enfin, la pénicilline inhibe la réaction de STICKLAND (94) ou réaction de désamination couplée par oxydo-réduction, avec diminution concomitante de la libération d'ammoniaque.

Donc le métabolisme peptidique est fortement perturbé par la pénicilline.

4. ACTION SUR LE METABOLISME RIBONUCLEIQUE.

En 1948, VENDRELY et TULASNE (246) ainsi que GALE (76) ont noté que la synthèse de l'A.R.N. chez des bactéries se développant en présence de quantité subléthale de pénicilline est diminuée environ d'un tiers.

PRESTIDGE et PARDEE en 1957 (182) ont repris cette étude et ils ont observé que l'A.R.N. d'une souche d'*Escherichia coli* traité par la pénicilline, diminue non seulement d'une manière quantitative, mais encore acquiert des propriétés de solubilité particulières puisqu'il devient soluble dans 5 pour cent d'acide trichloracétique. Si l'agent responsable de cette solubilisation n'est pas exactement connu, ces deux auteurs ont pu cependant démontrer que cet effet était étroitement lié à l'action léthale de la pénicilline pour trois raisons.

1°. la concentration de pénicilline capable de provoquer la mort de bactéries est semblable à celle qui provoque la solubilisation du R.N.A.

2°. les conditions qui protègent les bactéries de l'action léthale de la pénicilline empêchent la solubilisation du R.N.A.

3°. le temps de contact avec la pénicilline qui entraîne l'action léthale entraîne la solubilisation du R.N.A.

Ils ont, de plus, montré que la pénicilline ne provoque pas la synthèse d'une nouvelle ARNase et que l'ARNase présente n'est pas responsable de la dégradation de l'A.R.N. formé. Ils ont alors pensé et prouvé que le phénomène dépendait de la *formation* d'une "substance" responsable de l'action lytique. Ils n'ont pas isolé cette substance mais leur démonstration permet d'affirmer que l'effet lytique de la pénicilline ne serait qu'un effet secondaire et tardif qui exigerait le métabolisme microbien.

En utilisant des sels de Ba, en 1952, PARK (171) isola des composés phosphorés qu'il identifia comme étant des dérivés de l'uridine 5' pyrophosphate liés à la N acétyl glucosamine qui peut être elle-même unie ou non à une molécule d'alanine ou à un peptide formé de L lysine, d'acide D glutamique et de trois résidus d'alanine. Pensant que ces nucléotides intervenaient pendant la synthèse protéique, en tant que co-enzymes ou transporteurs de certains amino acides, HOTCHKISS en 1945 supposa que l'accumulation de ces composés était responsable de la diminution de la synthèse protéique.

C'est en 1957 que PARK (173) et STROMINGER (226) ont démontré que ces mononucléotides étaient une accumulation des précurseurs des constituants de la paroi bactérienne. Ce sont eux qui les premiers ont émis l'hypothèse du rôle prépondérant de la pénicilline dans l'inhibition de la synthèse de la paroi.

En 1959, ROGERS et MANDELSTAM (194), ont montré que la pénicilline n'inhibait l'incorporation de certains amino acides que dans le mucocomplexe de PARK de *Staphylococcus aureus*, et pas dans celui d'*Escherichia coli*. Ce furent NATHENSON et STROMINGER (157) et SALTON (203) qui mirent en évidence que l'acide diamino pimélique ne se combinant pas au glucose (264) (202) ne pouvait pas être incorporé dans la paroi d'*Escherichia coli*. BAYER (16) a été capable de montrer une forte diminution de l'acide pimélique dans la paroi d'*Escherichia coli*.

En 1962, WYLIE et JOHNSON (264) et ROBERTS et JOHNSON (189) purent donner la preuve biochimique de l'effet spécifique de la pénicilline sur la paroi d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis*. Ces parois contiennent autant d'azote, de phosphore, de lipides et de sucres réducteurs que les parois de germes normaux, mais contiennent moins de sucres aminés : moins de glucosamine, d'acide muramique et d'acide diaminopimélique.

La pénicilline est donc considérée de nos jours comme inhibant la synthèse de la paroi des germes à Gram positif et négatif (141) (68) (31) (187) (193) (190).

C. MODE D'ACTION DE LA PENICILLINE.

Son action s'exercerait essentiellement sur le glycopeptide ou peptidoglycane (255) appelé mucopeptide de Park, qui est considéré comme l'ossature de la paroi responsable de la rigidité et de la perméabilité cellulaire. Chez les bactéries à Gram positif, ce mucocomplexe représente 50 à 90 pour cent des constituants de la paroi. Chez les bactéries à Gram négatif, il ne représente environ que 10 pour cent et il est profondément imbriqué dans les couches du complexe glucido-protido lipidique. Il est lié covalentiellement à d'autres polymères et hétéropolymères comme l'acide teichoïque (85) ; d'après NERMUT (240), l'acide teichoïque formerait une couche plastique dentelée entourant extérieurement le complexe. Des autolysines (83) (84) servant à ouvrir des ponts au moment de l'incorporation d'une nouvelle fraction ont été identifiées à l'intérieur même de la paroi des bactéries. Ces autolysines seraient inhibées par les ions Mg^{++}. (240).

Pour expliquer le mécanisme d'action de la pénicilline, faisons un bref rappel de la structure et de la synthèse de la paroi (122) (35) (147) (85).

Le glycopeptide est constitué d'un nombre restreint de constituants : 4 ou 5 acides aminés et 2 sucres aminés.

Les acides aminés toujours présents sont la D et la L alanine, l'acide D glutamique et un acide aminé porteur de deux fonctions basiques : la L lysine ou l'acide diaminopimélique (D.A.P.) ; quelques bactéries ne contiennent ni lysine, ni D.A.P, mais possèdent un acide conservant un groupement NH_2 libre servant de point d'attache initial aux chaînes interpeptidiques.

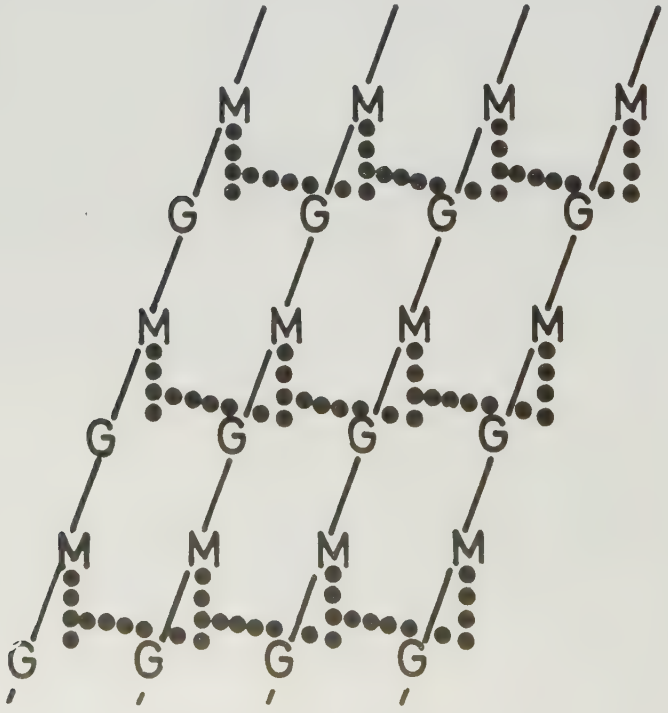
Les deux sucres aminés sont la N acétyl glucosamine (G) et l'acide N acétyl muramique (M) qui est un éther de la glucosamine.

Le D.A.P., l'acide muramique et les isomères D d'acides aminés n'ont jamais été rencontrés dans les protéines cytoplasmiques. C'est pour cela que l'on admet qu'ils seraient responsables de la résistance du glycopeptide à de nombreuses enzymes protéolytiques. D'autre part, comme la pénicilline inhibe l'incorporation du D.A.P. dans la paroi, cela prouve qu'elle agit spécifiquement au niveau du glycopeptide.

Dans toutes les parois bactériennes, la fraction polyosidique comprend des chaînes linéaires faites de l'alternance des deux sucres aminés G et M, le groupement -COOH libre de l'acide N-acétyl-muramique est lié par une liaison amide à une chaîne tétrapeptidique dont la séquence est la suivante :

L alanine - D glutamique - L lysine (ou DAP) - D alanine.

Les chaînes sont liées entre elles par des chaînes transversales ou ponts interpeptidiques, de nature variable allant de la D alanine terminale d'une chaîne à l'acide dibasique de l'autre. Ces ponts sont responsables de la troisième dimension du réseau glycopeptidique pariétal et probablement de la rigidité de l'ensemble. On admet que leur composition est caractéristique de l'espèce bactérienne considérée. GHUYSEN (85) représente de la manière suivante la paroi bactérienne de *Staphylococcus aureus* variété Copenhagen.



Structure spécifique de la paroi bactérienne, le glycopeptide est synthétisé selon un mécanisme propre à la bactérie qui ne suit en rien les lois de la bio-synthèse protéique.

Dans cet ensemble de réactions,STROMINGER (227) distingue trois stades successifs :

1 - Synthèse des nucléotides précurseurs : UDP - N acétyl glycosamine et UDP - N acétyl muramyl pentapeptide.

Ce sont les nucléotides que PARK et STROMINGER ont mis en évidence dans des cultures de *Staphylococcus aureus* traitées par la pénicilline.

2 - Formation d'un glycopeptide linéaire.

3 - Formation d'un glycopeptide réticulé par suite de la fermeture des ponts interpeptidiques.

Cette dernière phase a lieu à l'extérieur de la bactérie. En ce site extra-cellulaire, il n'y a pas d'ATP disponible pour effectuer la liaison interpeptidique. C'est la réaction de transpeptidation qui apporte l'énergie provenant d'une liaison peptidique préformée. Les précurseurs des constituants de la paroi possèdent des chaînes *penta*-peptidiques terminées par le dipeptide D Alanine - D Alanine . Or, la chaîne interpeptidique est *tétra*-peptidique et un seul D Alanine doit subsister. La fermeture du pont est liée à la perte du deuxième amino-acide.

C'est cette fermeture du pont qui est inhibée par les pénicillines et les céphalosporines.

D'après WISE et PARK, la majeure partie de la pénicilline est liée irréversiblement à un composant de la membrane cytoplasmique (37). Ce composant pourrait être la mureine peptidase car la pénicilline inhibe cette enzyme (193 - 262). Ces auteurs considèrent la pénicilline comme étant un dérivé de la L cystéinyl- D valine. Et ils admettent que stériquement la pénicilline est analogue au dipeptide L alanine - D glutamique du glycopeptide. Mais en 1965, TIPPER et STROMINGER ont montré que le COOH en α de l'acide glutamique est chez le staphylocoque substitué par un groupe amide, ce qui est incompatible avec l'analogie stérique proposée par WISE et PARK (229 - 241).

En 1962, COLLINS et RICHMOND (35) avaient déjà avancé l'hypothèse d'une analogie structurale entre la molécule de pénicilline et celle de l'acide N acétyl muramique. Mais cette hypothèse,qui n'expliquait pas l'inhibition de la transpeptidation, fut abandonnée.

A l'heure actuelle, la pénicilline est considérée par ERLANDER et GOODS (68) et STROMINGER et TIPPER (227) (241) comme un analogue structural de l'extrémité D alanyl - D alanyl du glycopeptide. Ces auteurs admettent que la liaison β lactame peut avoir une position identique à celle de la liaison -CO - N du dipeptide D ala - D ala, situé à l'extrémité du glycopeptide. La pénicilline réagirait avec la transpeptidase, sa liaison amide -CO-N pourrait acyler le site de transfert

avec ouverture du pont β lactame et formation d'un acide pénicilloïque et d'une enzyme inactive. Le glycopeptide obtenu est peu rigide et permet la sphéroplastisation des germes.

Le mécanisme d'action est représenté dans le schéma suivant :

(voir schéma page 19).

Ces résultats de TIPPER et STROMINGER permettent de comprendre pourquoi la pénicilline est plus active à faible dose qu'à forte dose, et pourquoi l'action léthale de la pénicilline exige le métabolisme microbien. A forte dose, le germe est stoppé dans sa croissance, mais conserve sa paroi intacte. Des persisters peuvent survivre. En thérapeutique, cette théorie explique par sa spécifité d'action pourquoi la pénicilline est inactive sur le métabolisme des cellules de l'hôte auquel elle est administrée (240). Enfin, il est compréhensible que les germes à Gram + dont la paroi est formée presque exclusivement de glycopeptides soient plus sensibles à la pénicilline que les germes à Gram négatif qui possèdent seulement 10 pour cent du glycopeptide. Cette théorie est admise à l'heure actuelle et elle permet d'expliquer de nombreux troubles morphologiques : formation de sphéroplastes fragiles et viables (170), ainsi que de nombreux troubles métaboliques :

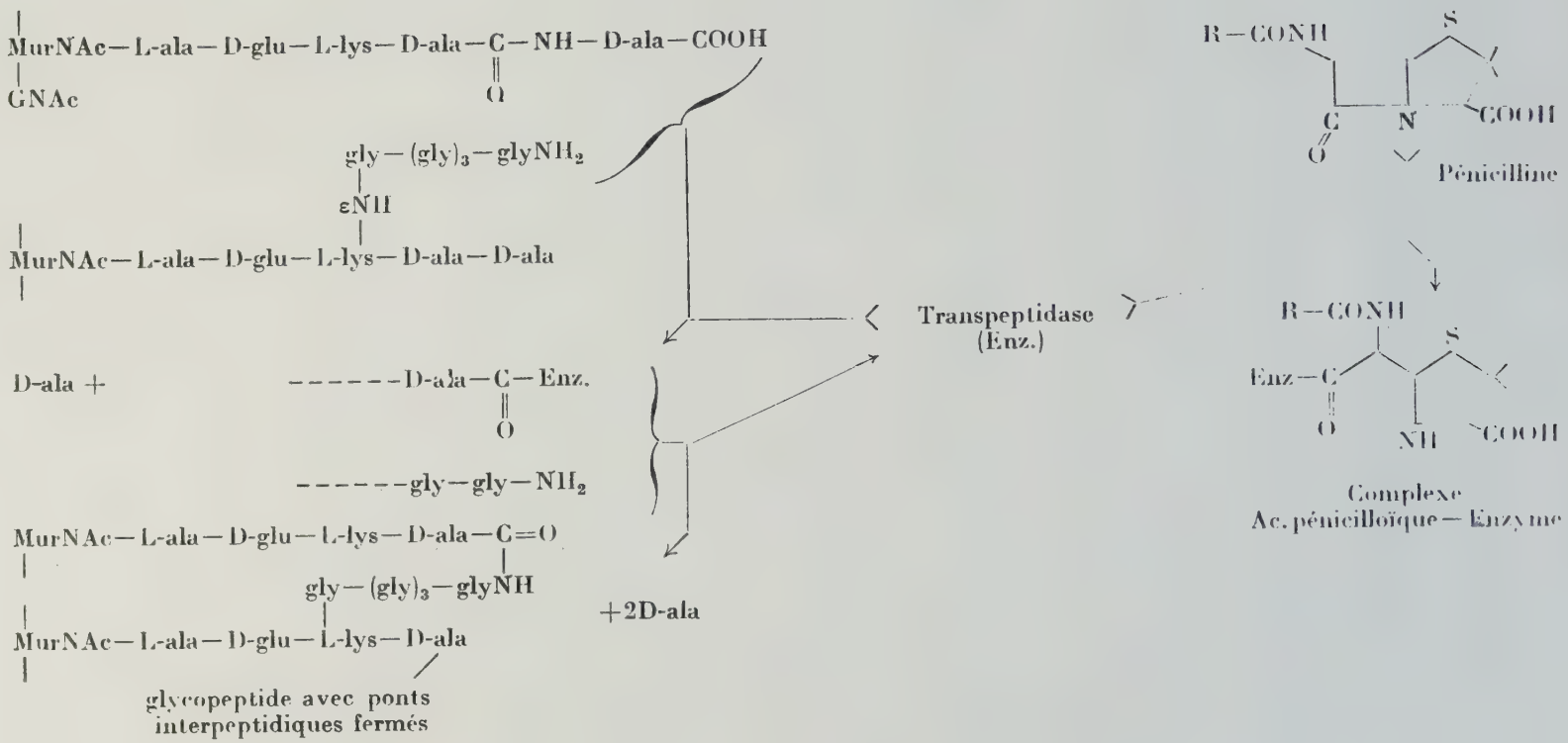
1°) L'inhibition de la synthèse de l'acide teichoïque n'est qu'apparente, il n'y a qu'une diminution du nombre d'accepteurs qui fixent covalentiellement l'acide sur le glycopeptide. Chez *Staphylococcus aureus*, la cytidine diphosphoribitol, précurseur de cet acide, s'accumule avec les autres nucléotides (205).

2°) L'inhibition de l'incorporation de l'acide glutamique n'a lieu qu'après 30 minutes de contact des germes avec la pénicilline. Or, HANCOCK (99) prouve qu'en milieu saccharosé, les sphéroplastes sont capables d'assimiler de petites quantités de cet amino acide et ce, pendant un temps assez long. L'assimilation est donc dépendante de l'intégrité de la paroi bactérienne.

3°) PARK (172) pense qu'apparemment il n'y a aucune raison logique pour que l'inhibition de la synthèse du mucopeptide en elle-même provoque la *lyse* des germes et la seule explication possible d'après lui, est que des bactéries en croissance active ont des enzymes, les autolysines, qui attaquent le mucocomplexe, de telle sorte que l'inbibition de la synthèse couplée avec une activité continue des enzymes dégradatives, peut conduire à la lyse ou, en présence de milieu convenable, à la conversion en sphéroplastes.

4°) La simple accumulation des précurseurs nucléoprotidiques de la paroi est capable de réduire un tiers environ de la synthèse du R.N.A. chez *Staphylococcus aureus*, réduction due uniquement au blocage des molécules d'uridine qui ne peuvent plus être utilisées pour les autres synthèses (PARK (173) et STROMINGER (226)).

5°) TANI et HENDLER (242) en utilisant des amino acides radioactifs localisèrent dans des sphéroplastes d'*Escherichia coli*, le site



Schémas de la transpeptidation et de son inhibition par la pénicilline proposés par Tipper et Strominger

initial de la synthèse des protéines au niveau de la membrane bactérienne.

Ainsi, il apparaît que la théorie de TIPPER et STROMINGER permet d'expliquer de nombreux désordres métaboliques qui sont provoqués par l'action de la pénicilline.

Pourtant, dès 1960, HUGO et RUSSEL (109) (110) (111) en cultivant *Aerobacter cloacae* à des températures comprises entre 18 et 37degrés de façon à avoir des pousses plus ou moins rapides et en utilisant des inoculums variables, ont montré que la *survie* des germes traités à la pénicilline n'était pas liée à la formation des sphéroplastes. Ils en *conclurent* que l'effet léthal de l'antibiotique n'était pas une *conséquence* de la *fragilité*, rappelant que SMITH et coll. (218) avaient même été incapables d'induire des sphéroplastes par la pénicilline chez un autre *Aerobacter cloacae*.

En 1961, FOLDES et MOLNAR (73) utilisèrent une souche de *Bacillus cereus*, possédant une forte β lactamase. L'enzyme hydrolysait en 10 minutes 100 unités par ml de pénicilline. Pendant ce temps, la densité optique de la culture ne changeait pas, elle augmentait même légèrement. La lyse graduelle ne survint qu'ultérieurement,donc en l'absence de pénicilline ; probablement ce temps était nécessaire pour que le germe élabore une enzyme induite responsable du processus de lyse. Pour étayer leur hypothèse, les auteurs ont dissocié les facteurs influençant soit la production de pénicillinase,soit la lyse des germes. La production de pénicillinase est maximum en eau peptonée, alors que la lyse des germes exige dans le milieu la présence des extraits de levure et du glucose, le glucose ayant tendance à inhiber la pénicillinase. Donc, la lyse n'est pas une conséquence directe de l'action de la pénicilline.

En 1963, BOMAN et ERICKSON (25) ont observé que la lyse d'*Escherichia coli* par l'ampicilline était dépendante de la quantité de pénicilline introduite, inversement proportionnelle à la vitesse de pousse et *indépendante* du nombre de germes. Ainsi la lyse bactérienne ne semble pas due uniquement à une fixation de la pénicilline sur le germe, mais doit dépendre d'une substance "élaborée" par le germe. En effet, ces auteurs montrent que l'addition de pénicillinase, après traitement du germe par la pénicilline ne peut plus inhiber la lyse. De plus, constatant que l'addition d'un amino acide comme la valine, potentialise l'action lytique de l'acide 6 amino pénicillanique vis-à-vis d'*Escherichia coli*, ils concluent que la chaîne latérale doit jouer un rôle dans la lyse. En effet, le 6 APA ayant la même fonction β lactame que la pénicilline, bloque les mêmes sites accepteurs donc devrait avoir la même activité antibiotique.

C'est en 1957 que PRESTIDGE et PARDEE ont suggéré que le mécanisme d'action de la pénicilline devait se dérouler en deux temps. D'après ces auteurs, la fixation de la pénicilline sur le germe devait induire la formation d'une protéine active "qui seule possédait la capacité d'attaquer la membrane". L'importance de l'effet de la protéine dépendrait de la concentration du milieu en pénicilline, et de la "condition" de la bactérie, voire même de la souche. Dans un premier temps,

la fixation de la pénicilline sur le germe entraînerait la formation de petits trous dans la paroi, ce qui produirait la modification de sa rigidité et de sa perméabilité, mais non la lyse de la bactérie. Et il faut que le métabolisme microbien ait lieu pour que la pénicilline soit antibiotique. Les auteurs ont pu montrer que la synthèse des protéines était indispensable à l'action bactéricide de la pénicilline puisque l'addition au milieu de chloromycétine, de 5 méthyl tryptophane ou d'azide de Na (0,02 M) inhibe l'action lytique de la pénicilline (115).

L'agent lytique n'a pas été isolé et identifié par les auteurs, mais ils ont démontré son existence de la manière suivante : ils ont mis en contact des sphéroplastes bactériens avec deux pellets de centrifugation de bactéries, dont un seul a été traité par la pénicilline, le second servant de témoin. L'expérience a montré une brusque diminution de la DO dans le tube contenant le pellet de centrifugation traité à la pénicilline; dans le tube témoin, la DO est restée constante. L'effet lytique paraît donc lié à la présence d'une "substance" dans les germes préalablement traités par l'antibiotique. Cet effet serait même conservé après chauffage du pellet 10 minutes à 100° C.

L'hypothèse de l'action de la pénicilline en deux temps peut être étayée par les travaux assez récents de PENNINGTON et O'GRADY (175). *Staphylococcus aureus* traité à la pénicilline demeure viable bien après arrêt de la synthèse de la paroi de la bactérie puisqu'il demeure réversible pendant un court laps de temps. Donc, il y aurait dissociation entre la notion de fixation de la pénicilline sur les transpeptidases et la notion de lyse bactérienne (124) (192).

D'autre part, en 1963 PARK (172) réussit à montrer que la fixation de la pénicilline n'inhibe pas toujours la synthèse du mucopeptide. En effet, des bactéries traitées à la pénicilline, puis lavées, qui contiennent donc de la pénicilline fixée irréversiblement, sont parfaitement capables de synthétiser le mucopeptide à 100 pour cent (PARK, GRIFFITZ et STEVENSON). Donc l'inhibition de la synthèse du mur de la bactérie est dépendante de la croissance bactérienne.

De tout cet exposé, il ressort que le mécanisme d'action de la pénicilline est très complexe et n'est pas encore totalement connu. Chaque théorie s'appuie sur un effet particulier provoqué par la pénicilline, mais n'explique pas tous les désordres métaboliques.

Il nous paraît cependant indéniable que la pénicilline agit en deux temps. Toutes les observations de LATRILLE (129) sur les différences de morphologie et de stabilité des sphéroplastes benzylpénicilline et des sphéroplastes 6 amino pénicillanique tendent à le montrer. Les deux pénicillines possèdent la fonction réactive β lactame. Or, d'après l'auteur, dans des cultures d'entérobactéries, selon la pénicilline utilisée, les sphéroplastes induits sont très différents. Si les sphéroplastes pénicilline sont essentiellement fragiles, instables et obtenus uniquement en milieu hypertonique, les sphéroplastes 6 APA sont au contraire d'une grande vitalité et d'une grande résistance, obtenus avec de faibles concentrations d'inducteur en milieu isotonique comme en

milieu hypertonique. Passionnante a été l'étude de ces sphéroplastes à la microscopie électronique puisque l'auteur a pu montrer que l'attaque des parois par les deux pénicillines était très différente. Les sphéroplastes 6 APA ont une paroi intacte, alors que les sphéroplastes pénicilline en ont une très modifiée. Or, le 6 APA n'est pas inactif sur les germes, en particulier la structure chromatinienne des sphéroplastes est très dispersée. Chimiquement la seule différence qui existe entre les deux pénicillines réside dans la présence d'une chaîne latérale dans la molécule de benzylpénicilline.

De ces observations, l'auteur en a conclu trois ordres de faits :

1°) il a observé une dissociation totale entre l'antibiose et l'apparition des sphéroplastes.

2°) la fonction β lactame ne semble pas indispensable pour provoquer l'arrêt de la synthèse de la paroi bactérienne, la désorganisation de la structure et la lyse bactérienne, puisque le 6 APA n'agit pas comme la benzylpénicilline.

3°) il semble qu'il faille accorder un rôle très important à la présence et à la composition chimique de la chaîne latérale, le 6 APA et les diverses pénicillines semi-synthétiques se comportant très différemment vis-à-vis d'une même souche. La nature de la chaîne latérale pourrait jouer un rôle tout autre que stabiliser uniquement la fonction β lactame ou rendre la pénicilline résistante en milieu acide. Cette opinion est d'ailleurs celle d'auteurs comme HUGO et RUSSEL et BOMAN et ERICKSON qui ont observé que la valine potentialise l'action antibiotique du 6 APA. Ils en ont conclu que la valine devait se comporter vis-à-vis du 6 APA comme une chaîne latérale.

Tout ceci tend donc à montrer que la théorie de TIPPER et STROMINGER ne semble expliquer qu'un seul désordre métabolique, celui de l'accumulation des nucléotides précurseurs de la synthèse de la paroi entraîné par la fixation spécifique de la pénicilline sur la transpeptidase. Un auteur comme GARRET (80) a récemment observé que la privation en Mg^{++} d'un staphylocoque provoque le même désordre métabolique. Donc l'effet de la pénicilline n'est peut-être pas aussi spécifique que ce que l'on croit. D'autre part, la théorie de TIPPER et STROMINGER n'explique ni l'action lytique secondaire de la pénicilline, ni les désordres touchant la perméabilité de la paroi, ni les modifications de solubilité de l'acide ribonucléique formé, ni les impossibilités d'incorporer spécifiquement certains amino acides.

Pour notre part, nous avons été séduite par la masse d'arguments présentés par PRESTIDGE et PARDEE et par leur théorie qui permet de comprendre pourquoi la croissance bactérienne est indispensable pour que se manifeste l'effet bactéricide de la pénicilline. D'autre part, LATRILLE avait observé la présence de la molécule de pénicillamine dans des milieux de culture où des sphéroplastes d'*Escherichia coli* avaient été induits par la benzyl pénicilline. Cette molécule est d'apparition tardive, elle pourrait donc être formée après quelque métabolisme microbien secondaire. Enfin, cette molécule est attirante car elle

possède trois fonctions chimiques particulièrement réactives, possède une analogie structurale avec la cystéine et la valine et a un petit poids moléculaire, ce qui permet une pénétration facile. La fonction -SH libre de cette molécule est particulièremett intéressante car elle pourrait intervenir dans les phénomènes d'oxydo-réduction, indispensables à la respiration et à la division microbienne. D'autre part, ses fonctions chélatrices pourraient expliquer une certaine perte du germe en cations bivalents, effet qui selon GARRET pourrait entraîner un désordre de synthèse nucléotidique.

Aussi ce travail comprendra trois parties :

1°) Les conditions opératoires et les caractéristiques de la production de pénicillamine par les entérobactéries.

2°) Les effets spécifiques de la pénicillamine sur la morphologie et quelques activités enzymatiques.

3°) l'action potentialisatrice de la pénicillamine sur l'activité antibiotique des pénicillines, action comparable à celle de la valine sur le 6 APA (HUGO et RUSSEL).

Nous montrerons ainsi que la pénicillamine pourrait être la molécule soupçonnée par PRESTIDGE et PARDEE qui jouerait un effet secondaire dans l'activité antibiotique des pénicillines.

---°---

PREMIERE PARTIE

PRODUCTION DE PENICILLAMINE AU COURS DE L'HYDROLYSE BACTERIENNE DES PENICILLINES

Chapitre I

PRODUCTION DE PENICILLAMINE AU COURS DE L'INDUCTION DE SPHEROPLASTES PENICILLINE CHEZ E. COLI O_{111} B_4

J. LATRILLE a donc observé au cours de recherches sur les rapports entre l'action antibiotique et l'induction de sphéroplastes par les pénicillines et certains de leurs dérivés, que, lors de la transformation en sphéroplastes de diverses entérobactéries par la Pénicilline G selon la technique de CHARGAFF, une certaine quantité de pénicillamine apparaissait après 24 ou 48 heures d'incubation.

Dans ce premier chapitre, nous avons essayé de préciser les conditions d'apparition de ce métabolite dans un système expérimental utilisant la Pénicilline G et *Escherichia coli* O_{111} B_4 *n° 3.*

I. MATERIEL ET METHODES.

A. CONDITIONS OPERATOIRES.

1- Nous avons utilisé les milieux suivants :

- *Milieux normotoniques :*

a) Milieu B.P.G. de GUILLAUME, MARTIN et DERIEUX (95) dont la formule est la suivante :

Cl Na	5 g
HPO_4 K_2	1 g
Extrait de levures	3 g
Extrait de viande Liebig	3 g
Protease - Peptone DIFCO	10 g
Glucose	4 g
Eau distillée q.s.p.	1.000 ml

Le milieu est ajusté à pH = 7,4 et stérilisé 30 minutes à 120° . Pour stabiliser les sphéroplastes, le milieu est additionné de 0,33 % de SO_4Mg.

b) le milieu PENASSAY DIFCO

c) le milieu synthétique de MONOD dont la formule est la suivante :

$H_2 PO_4 K$	2 g
$Cl NH_4$	0,5 g
$SO_4 Mg$	0,03 g
$SO_4 Fe$.....	0,005 g
$Cl_2 Ca$	0,01 g
Eau distillée q.s.p.....1.000 ml	

Le milieu est ajusté à pH = 7, puis stérilisé 15 minutes à 120°. Il est additionné de glucose à 0,5 pour cent comme source de carbone et 1 µg de nicotinamide.

- *Milieux hypertoniques :*

Les mêmes milieux deux fois plus concentrés sont additionnés d'un volume égal d'une solution de saccharose à 40 %, stérilisée par filtration sur Seitz, E K S à 50 pour cent d'amiante.

2- *Inoculum :* Les milieux sont ensemencés avec une culture de 4 heures sous agitation à 37°C d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 n° 3. L'inoculum est mesuré au spectrophotomètre Unicam SP 600 à λ = 670 m µ et ajusté de façon à obtenir dans les milieux de culture une suspension bactérienne de 600 $\bar{M}$ de germes par ml. Après une demi-heure d'incubation, les tubes ainsi ensemencés sont additionnés de Pénicilline G sous forme de benzyl pénicillinate de Na (*) en solution aqueuse préparée extemporanément.

B. IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DE LA PENICILLAMINE, DE LA BENZYL PENICILLINE ET DE QUELQUES DERIVES.

1 - Extraction de la pénicillamine et des autres dérivés à partir des milieux de culture.

L'extraction a été faite à partir du milieu de MONOD saccharosé à 20 pour cent, incubé pendant 24 heures à 37°C. Après centrifugation à 8.000 tours minute pendant 30 minutes, le surnageant est passé sur filtre Seitz . Le filtrat ainsi préparé est alors passé sur une colonne de résines Amberlite I.R. 400, 250-50 mesh, utilisé sous sa forme acide. Cette résine échangeuse d'anions est placée dans une colonne L K B (26 x 410) équipée d'un détecteur U.V. et d'un enregistreur et elle est lavée à l'eau bi-distillée jusqu'à neutralité avant l'emploi.

* *Spécilline SPECIA.*

Le saccharose ne se fixe pas et est éliminé par rinçage soigneux à l'eau bi-distillée jusqu'à ce que la réaction de l'eau de lavage après hydrolyse acide soit négative au Fehling. La pénicillamine et les produits d'hydrolyse fixés sur la colonne sont alors élués par 100 ml environ d'HCL N. La pénicillamine, identifiée par la méthode de PAL, est éluée dans le front de la solution d'HCL N, la benzylpénicilline et les autres produits d'hydrolyse sont élués plus tardivement mais séparément. L'identification a été faite par chromatographie sur papier.

2 - Identification de la pénicillamine et des autres dérivés.

Après neutralisation avec NaOH N, 5 µl de l'éluat sont déposés sur papier Whatman n° 1 et soumis à la chromatographie ascendante dans le mélange butanol/acide acétique/eau dans le rapport v/v de 125/30/125. Ce mélange est un système à deux phases. La phase inférieure est la phase saturante, la phase supérieure est la phase migrante. Les chromatogrammes sont révélés par pulvérisation de ninhydrine à 0,4 pour cent en solution acétonique suivie par 10 minutes de passage à l'étuve à 100°C. La migration et l'aspect des spots ainsi révélés ont été comparés à des témoins préparés à partir de produits purs et soumis à la chromatographie dans des conditions identiques. Quatre spots ont été identifiés :

- la benzylpénicilline donne un spot violet de rf = 0,95
- la pénicillamine donne un spot violet de rf = 0,11
- l'acide benzyl pénicilloïque donne un spot violet de rf = 0,73
- le noyau 6 APA donne un spot de couleur rose mauve de rf = 0,47.

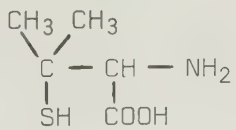
L'identification de ces quatre spots a été complétée grâce à des réactions spécifiques.

- L'acide benzyl pénicilloïque et la pénicillamine ont été révélés par la méthode à l'iode de SNEATH et COLLINS (222) et la méthode de GOLDMAN et DAY (86). La même méthode permet de révéler la benzylpénicilline après transformation de celle-ci en acide benzyl pénicilloïque soit par action de βlactamase (239), soit de NaOH N (239), soit d'NH_3 qui forme alors l'amide correspondant (86).

- L'acide benzyl pénicilloïque est décomposé par Cl_2 Hg en aldéhyde pénaldique qui réagit avec le réactif de SCHIFF (20).

3 - Dosage de la pénicillamine.

La pénicillamine est dosée directement dans les milieux de culture ; c'est la β diméthyl-cystéine, donc un acide α aminé possédant en β une fonction -SH libre.



La méthode de PAL (169) a été mise au point pour le dosage de cette molécule dans les urines de patients atteints de maladie de Wilson.

Principe :

la fonction -SH activée par les deux fonctions méthyls en position α réagit avec les ions ferriques en présence de cyanure de K^+ en donnant une coloration bleue.

Technique :

à 2 ml d'échantillon, neutralisés au préalable, 0,5 ml d'une solution de CNK 0,2 M et 0,5 ml de Fe Cl_3 15 mM, sont ajoutés. Cette solution est portée 5 minutes à 65°C. On complète à 5 ml et le précipité de Fe $(OH)_3$ est éliminé par centrifugation. La DO du surnageant est faite au spectrophotomètre à λ = 645 m μ.

4 - Dosage de la benzyl pénicilline.

Dans cette partie de l'expérimentation, la benzylpénicilline extraite des milieux de culture, a été dosée par la méthode de BOXER, EVERETT (26) et FORD (74) modifiée par SNELL (223) et la méthode de SCUDI (213).

a) Extraction :

- *Principe :*

la benzylpénicilline est extraite par l'acétate d'isoamyle en milieu tamponné au glycocolle selon la technique de CHARGAFF. Le tampon de pH = 1,5 a la formule suivante :

glycocolle	45 g
HCl pur d : 1,18	50 ml

Seule la pénicilline est soluble dans le solvant organique.

- *Technique :*

20 ml de la solution de pénicilline sont amenés à pH = 2 par addition de 5 ml de tampon glycocolle. Ce mélange est placé dans une ampoule à décanter et additionné de 20 ml d'acétate d'isoamyle. Après agitation vigoureuse, on laisse les phases se séparer. La phase amylique est recueillie et déshydratée par du SO_4Na_2 anhydre. 10 ml d'acétate d'isoamyle sont extraits dans une ampoule à décanter par 10 ml d'une solution de CO_3HNa à 2 pour cent. La benzylpénicilline transformée en pénicillinate de sodium passe de la phase amylique à la phase aqueuse. Plus de 80 pour cent de la pénicilline sont ainsi extraits. Cette extraction doit être faite avec précaution après agitation vigoureuse et uniforme à basse température car la pénicilline en solution aqueuse tend à se décomposer spontanément.

b) Dosage à l'hydroxylamine :

C'est la méthode modifiée par SNELL (223) qui a été utilisée.

- *Principe :*

L'hydroxylamine ouvre le pont β lactame et donne un acide hydroxamique stable pendant deux heures. Cet acide produit avec les ions ferriques un complexe coloré d'hydroxamate ferrique.

- *Technique :*

à 1 ml de la solution à doser, on ajoute 3 ml du réactif suivant : 1 volume d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 37 pour cent et 1 volume d'une solution aqueuse de Na OH à 17,7 pour cent contenant 2 pour cent d'acétate de sodium anhydre, sont mélangés avec 4 volumes d'alcool éthylique. Ce réactif est préparé au moment de l'emploi. Après mélange soigneux, on attend 3 minutes, puis on ajoute dans chaque échantillon 1 ml du réactif suivant :

Sulfate de fer ammoniacal	100 g
H_2 SO_4 RP D = 1,83	46,7 ml
Eau distillée q.s.p.	500 ml

Après agitation, l'intensité de la coloration obtenue est mesurée au spectrophotomètre à λ = 515 m µ, le zéro étant fait sur le blanc réactif obtenu par addition d'une goutte de bacto-pénase concentrée à 1 ml de la solution à doser.

Cette méthode assez peu sensible ne permet pas de doser moins de 100 µg par ml de pénicillamine. En outre, le mélange eau-alcool donne souvent des solutions troubles et difficiles à lire au spectrophotomètre.

c) Méthode de SCUDI.

- *Principe :*

Cette méthode est basée sur la réaction d'addition d'une amine forte et colorée, la N (1-naphtyl-4-azo-benzène) éthylène diamine sur la fonction β lactame de la benzylpénicilline. La condensation se fait avec un rendement de 90 pour cent. Les extractions sont nombreuses car il faut séparer l'amine coloréede l'amide.

- *Technique :*

Le réactif est préparé à partir d'aniline en solution chlorhydrique et de nitrite de sodium qui réagissent lentement sur la N (1-naphtyl) éthylène diamine. Le produit est purifié par extractions et cristallisations dans le Skellysolve C (b.p. 85 - 100 degrés).

A 15 ml de benzène contenant 10 ml de colorant, on ajoute 20 ml d'acétate d'isoamyle contenant la pénicilline et immédiatement après 5 ml d'une solution de 5 ml d'acide acétique glacial dans 1 litre de benzène. Le contact est maintenu 3 heures à la température ambiante

dans un récipient fermé. Placé dans une ampoule à décanter, ce mélange est agité vigoureusement 10 secondes avec 25 ml d'une solution de Na OH 0,05 N. Quand les deux phases sont séparées et sont limpides, la phase inférieure est lentement décantée. 25 ml de chloroforme sont alors ajoutés à la solution alcaline aqueuse et le tout est agité 10 secondes. Lorsque les deux phases sont séparées, le chloroforme est éliminé. 1 ml d'HCl concentré est ajouté à la solution aqueuse alcaline puis 15 ml du mélange suivant : 1 volume de butanol et 4 volumes de benzène. Le tout est agité 10 secondes et le produit de condensation passe dans la phase butanol-benzène.

A 10 ml de cet extrait, on ajoute 2 ml du mélange : 5 volumes d'HCl concentré et 95 volumes d'alcool absolu. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à λ = 540 m µ.

Cette méthode, très sensible, permet de doser 1µ g par ml, mais le temps de condensation de 3 heures et le temps d'extraction la rende très longue.

II. RESULTATS.

A. PRODUCTION DE PENICILLAMINE.

Après incubation à 37°C, la pénicillamine a été dosée et identifiée par chromatographie :

a) dans une série de tubes de milieux B.P.G., PENASSAY et MONOD, saccharosés à 20 pour cent et inoculés selon les conditions précédemment décrites, où nous avons induit des sphéroplastes avec 2.000 unités par ml de Pénicilline G.

b) dans des séries de tubes de mêmes milieux, non saccharosés mais ensemencés de la même manière et additionnés de mêmes quantités de pénicilline.

c) dans des séries de milieux non ensemencés, saccharosés et non saccharosés, qui ont servi de témoins.

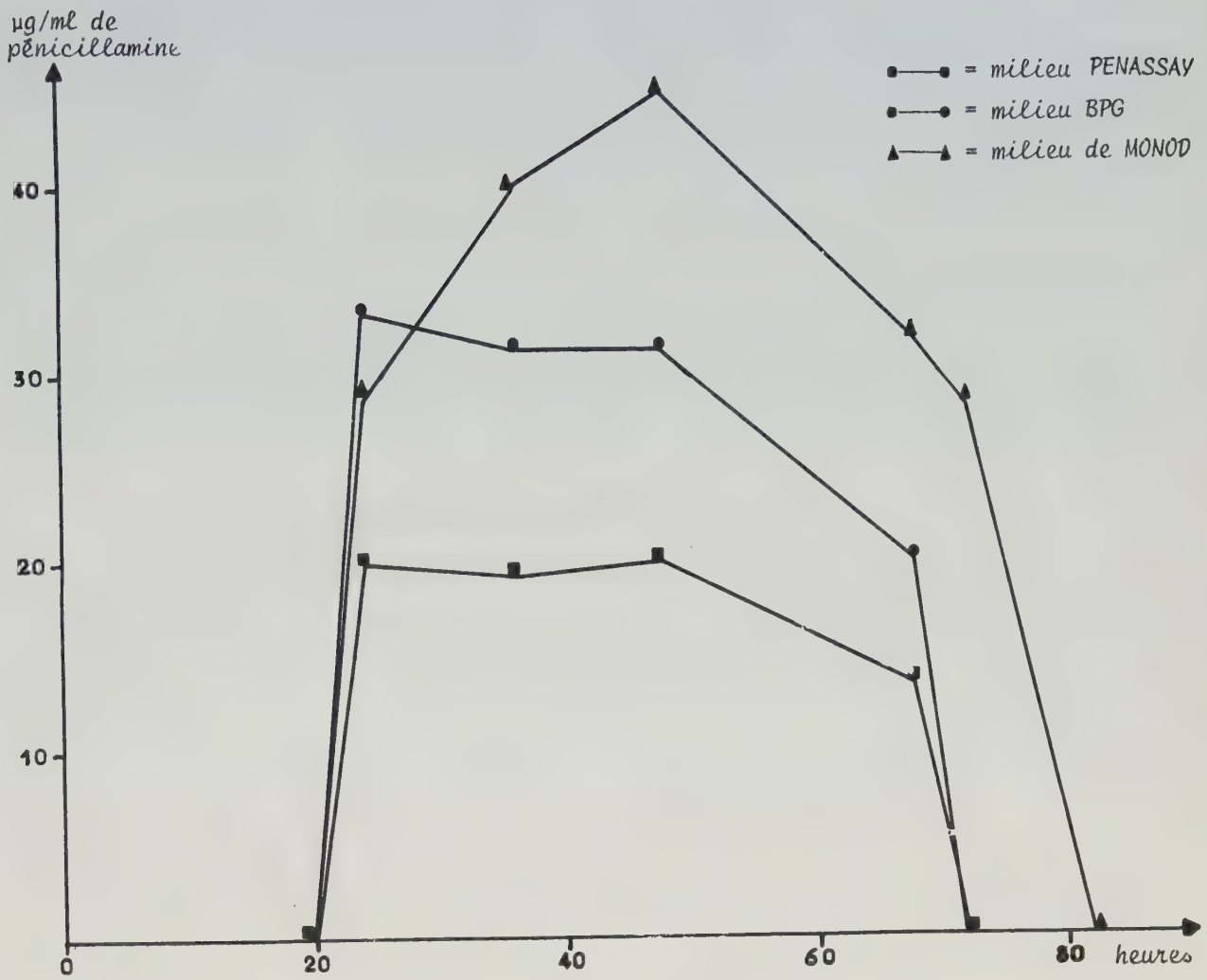
Ces expériences ont donné les résultats suivants :

- *dans tous les milieux normotoniques* ensemencés et non ensemencés aucune trace de pénicillamine ne peut être mise en évidence.

- *dans les milieux hypertoniques* saccharosés à 20 pour cent et ensemencés, la recherche de la pénicillamine demeure négative jusqu'à la vingtième heure, puis la réaction de PAL devient brutalement positive en une heure.

α) Après 24 heures d'incubation, le dosage de PAL indique des taux de pénicillamine différents en fonction du milieu de culture.

milieu B. P.G.	35 µg par ml
milieu Penassay	28 µg par ml
milieu de Monod	20 µg par ml



PRODUCTION DE PENICILLAMINE
EN FONCTION DU TEMPS ET DU MILIEU PAR E. COLI $O_{111}B_4$

F I G U R E I

β) Pendant 80 heures, nous avons suivi la production de pénicillamine dans les différents milieux en faisant un dosage de PAL à des intervalles de temps réguliers.

Jusqu'à la 48ème heure, les taux augmentent lentement, puis vont décroître plus ou moins lentement pour disparaître totalement après 80 heures de culture. La figure I montre que les quantités de pénicillamine dosées varient selon les milieux de culture utilisés, les milieux B.P.G. et Penassay paraissant les plus favorables. Dans le milieu Penassay à partir de la 36ème heure, on détecte plus de 20 à 30 pour cent de pénicillamine que dans le milieu B.P.G. et plus de 50 à 60 pour cent que dans le milieu de Monod.

Toutes ces expériences ont été fréquemment renouvelées. Tous les résultats sont reproductibles et au maximum les taux de pénicillamine varient de 10 à 12 pour cent entre deux expériences.

La vitalité de la souche paraît un facteur influençant nettement la production. Si on part de germes lyophilisés ou conservés en culot de gélose, des repiquages successifs des souches sont nécessaires avant leur utilisation.

B. FACTEURS INFLUENCANT LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE.

a) Si les conditions de culture sont les suivantes :

- inoculum de 600 $\bar{M}$ d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 n° 3
- quantité de benzylpénicilline par ml : 2.000 unités/ml
- température de culture : 37°C

certains paramètres importants peuvent être définis.

1 - Tonicité du milieu.

Les résultats précédents montrent que dans les milieux normotoniques, la pénicillamine n'est jamais décelable par la méthode de PAL, le dosage étant possible seulement en milieu hypertonique. Pour étudier ce phénomène, nous avons fait varier en milieu B.P.G. la concentration de saccharose de 5 à 30 pour cent.

(voir tableau I page suivante).

Saccharose	*0*	*5 %*	*10 %*	*15%*	*20 %*	*25 %*	*30 %*
Quantité de pénicillamine	0	20	21	25	38	34	23

Tableau 1 - Influence de la tonicité des milieux de culture sur la production de pénicillamine après 24 heures d'incubation.

Les résultats sont exprimés en µg par ml.

Le tableau montre qu'après 24 heures d'incubation, la teneur en pénicillamine varie en fonction de la tonicité du milieu. La production maximum est obtenue pour la concentration de 20 pour cent en saccharose. Ceci est peut-être en rapport avec un plus grand nombre de survivants.

2 - Agitation du milieu :

L'aération des cultures est un facteur important. Si les cultures sont soumises, en milieu hypertonique à 20 pour cent de saccharose, à l'agitation 24 heures au bain-marie, la méthode de PAL ne détecte que des traces de pénicillamine. Ceci laisse supposer que la fonction -SH a été modifiée, l'agitation favorisant probablement l'oxydation de cette fonction.

Cependant tous les essais de production de la pénicillamine dans des conditions strictes d'anaérobiose, en tubes de Hall par exemple, ont été négatifs. Une aérobiose relative semble indispensable.

3 - Le pH. :

La pénicillamine est un produit de dégradation acide de la pénicilline. Si la culture d'*Escherichia coli* abaisse suffisamment le pH du milieu, l'apparition de ce métabolite pourrait être la conséquence d'une dégradation spontanée de l'antibiotique en milieu acide.

Pour éliminer cette hypothèse, on a mesuré au pHmètre Quéré le pH de chaque milieu de culture, préalablement débarrassé des corps microbiens par centrifugation. Les résultats enregistrés sont les suivants :

(voir tableau 2 page suivante)

pH		*Isotonique*	*Hypertonique*
B.P.G.	témoin	6,6	6,5
	coli	6,5	4,7
Penassay	témoin	6,5	6,75
	coli	6,4	4,4

Tableau 2 - Mesure du pH des milieux de culture d'Escherichia coli O_{111} B_4 après 24 heures de pousse.

Les milieux hypertoniques, où l'on trouve de la pénicillamine, semblent être davantage acidifiés que les milieux isotoniques. Cependant l'abaissement du pH paraît insuffisant pour provoquer l'hydrolyse spontanée de la pénicilline.

Pour vérifier cette hypothèse, deux sortes d'expériences ont été réalisées :

α - *abaissement du pH du milieu non ensemencé* additionné de pénicilline. Une série de tubes a été faite : on répartit 2.000 unités par ml de benzylpénicilline en milieu B.P.G. et Penassay et au pH mètre, on acidifie les milieux avec de l'HCl dilué de façon à obtenir une gamme comprise entre pH 3 et pH 7. On effectue des dosages après la 3ème, 5ème, 20ème, 24ème, 36ème, 48ème et 72ème heure d'incubation à 37°C. La pénicilline est partiellement dégradée aux pH acides, mais jamais la pénicillamine n'a été détectée dans ces tubes.

β - *abaissement du pH des milieux ensemencés* par des solutions tamponnées. La production de pénicillamine a été étudiée dans des milieux B.P.G. saccharosés à 20 pour cent.

. Le pH = 7,2 a été réalisé en utilisant le tampon TRIS 0,2 M (méthyl hydroxy aminométhane).

. Le tampon citrate de Soerensen 0,1 M additionné soit d'HCl, soit de Na OH a permis d'obtenir les pH acides 6,8 - 6 - 5 - 4 - 3.

Un milieu B.P.G. non ensemencé, mais tamponné et contenant de la benzylpénicilline a servi dans chaque cas de témoin. Les témoins ont toujours été négatifs.

Le tableau 3 indique les quantités de pénicillamine dosées dans ces conditions opératoires.

pH	*Témoin*	*22 h*	*30 h*
7,2	0	39	38
6,8	0	40	40
6	0	38	39
5	0	30	32
4	0	29	30
3	0	10	15

Tableau 3 - Production de pénicillamine en fonction du pH du milieu B.P.G. par E. coli O_{111} B_4
Les taux de pénicillamine sont exprimés en µg/ml.

La présence des solutions tamponnées ne semble pas perturber la production de pénicillamine. Or, l'ion citrate (70) comme l'ion phosphate (71) protège la molécule de Pénicilline G contre la dégradation spontanée. Il semble que c'est aux environs des pH neutres, que les taux de pénicillamine dosés sont les plus élevés, donc la production paraît être entièrement dissociée de l'acidification du milieu. En outre, aux pH étudiés, la benzylpénicilline ne s'hydrolyse pas spontanément en pénicillamine.

4 - Importance de la centrifugation avant le dosage de PAL.

Certains dosages ont été faits sur des milieux centrifugés, d'autres sur des milieux non centrifugés. Les résultats prouvent que la centrifugation diminue de près de 40 pour cent la quantité de pénicillamine produite par la souche. Ceci suggère qu'une certaine partie de la pénicillamine reste liée au germe.

5 - Influence de l'addition du Ca^{++} et du Mg^{++}.

Deux séries de tubes de milieu B.P.G. et Penassay saccharosés à 20 pour cent contenant 2.000 unités par ml de benzylpénicilline ont été additionnés soit de Cl_2Ca de façon à obtenir des concentrations finales de 0,05 et 0,01 pour cent, soit de SO_4 Mg aux mêmes concentrations.

La pénicillamine a été dosée après 20, 24, 48 et 72 heures d'incubation à 37°C dans ces séries de tubes ensemencés avec 600 $\bar{M}$ d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 n° 3. Une série préparée dans des conditions identiques sans Ca^{++} ou Mg^{++} servait de témoin.

Les résultats ont été différents selon le milieu et la concentration en cations.

a - en milieu B.P.G., la proportion de pénicillamine dosable dans le témoin, nulle à la 20ème heure, atteint 35 µg par ml à la 24ème heure, 32 µg par ml après 48 heures et disparaît vers la 72ème heure.

Dans les tubes additionnés de Ca^{++} ou de Mg^{++} les résultats sont très différents. La pénicillamine n'est dosable qu'à la 24ème heure et disparaît ensuite : pour 0,05 pour cent de Cl_2 Ca, il y a 21 µg par ml de pénicillamine, pour 0,01 pour cent de Cl_2 Ca, on trouve 16,5µg par ml de pénicillamine.

Avec le magnésium, le phénomène est encore plus net : à la concentration de 0,05 pour cent, on trouve 19 µg de pénicillamine, pour 0,01 pour cent il n'y a plus que 10 µg de pénicillamine.

- en milieu Penassay, dans le témoin, on trouve 28 µg par ml de pénicillamine après 24 heures, 37 µg par ml à la 48ème heure et 28 µg par ml après 72 heures. Dans le milieu contenant 0,05 pour cent de Ca^{++}, on dose 15 µg par ml de pénicillamine uniquement à la 24ème heure. Par contre, aucune trace de pénicillamine ne peut être trouvée dans les tubes additionnés de 0,01 pour cent de Ca^{++} ou de Mg^{++}, quelle que soit l'heure du dosage.

Il semble donc que de faibles concentrations de Ca^{++} et de Mg^{++} masquent d'une part la formation de pénicillamine libre et fassent disparaître d'autre part les faibles quantités de pénicillamine produites.

C'est ce que confirme la figure 2.

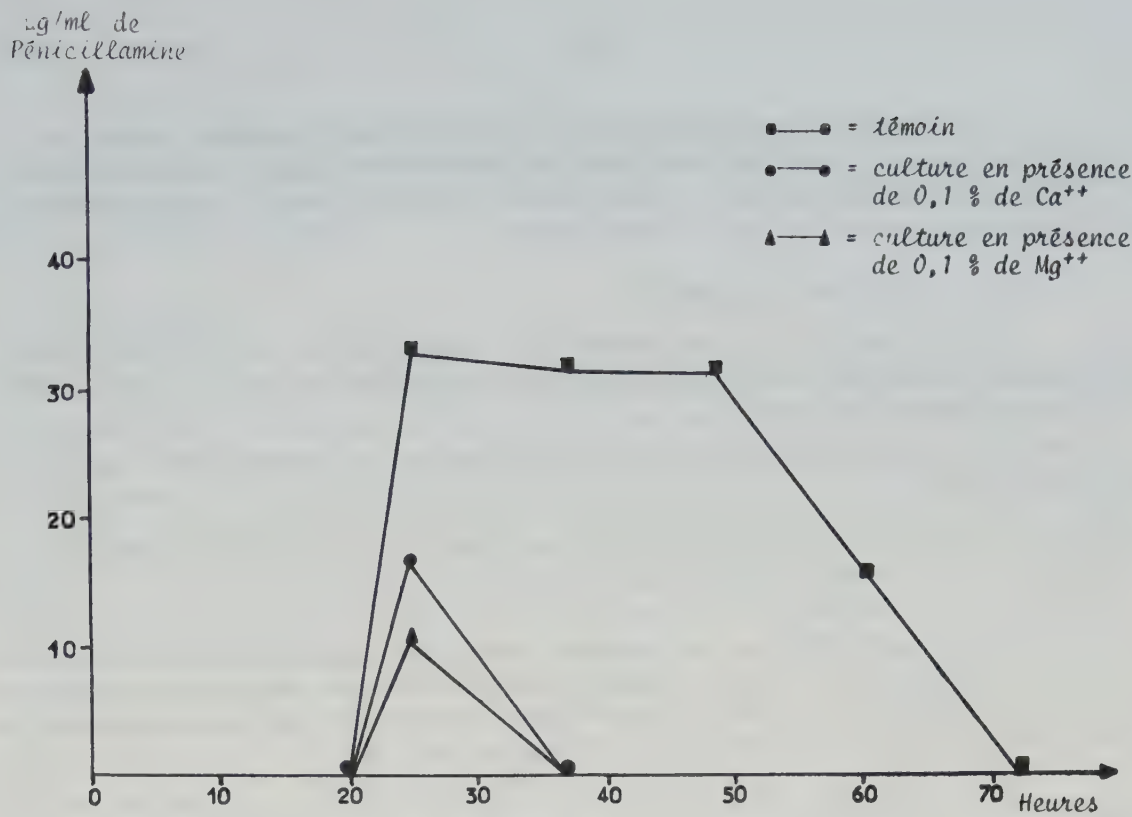
Ces résultats en rapport avec des phénomènes complexes de chélation montrent que le dosage de la pénicillamine peut dépendre de faibles variations de la teneur des milieux en cations divalents.

b - Si les conditions de culture varient :

1 - Inoculum variable .

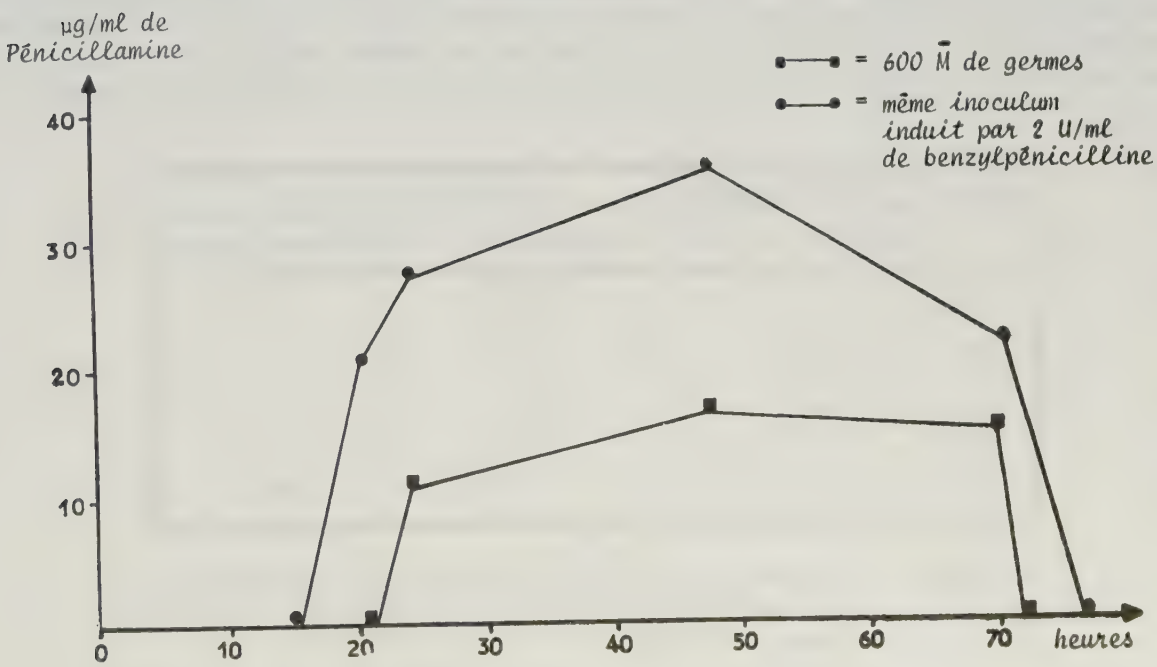
Les milieux B.P.G. sont ensemencés soit avec 600, soit avec 750 $\bar{M}$ de germes par ml ; la quantité de benzylpénicilline est toujours de 2.000 unités par ml. Les taux de pénicillamine dosée sont faibles car le milieu a été centrifugé avant le dosage.

On constate sur la figure 3 que pour une augmentation d'inoculum de 20 pour cent, la quantité de pénicillamine produite augmente de 20 pour cent. Ceci est vrai à la 24ème heure. Il semble exister un rapport entre la quantité de pénicillamine produite et le nombre de germes présents.



INFLUENCE DES CATIONS Ca^{++} ET Mg^{++} SUR LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE
E. COLI $O_{111}B_4$ - MILIEU BPG HYPERTONIQUE

FIGURE 2



PRODUCTION DE PENICILLAMINE EN FONCTION DU TEMPS PAR E. COLI $O_{111}B_4$
MILIEU BPG HYPERTONIQUE

FIGURE 3

De plus le moment d'apparition de la pénicillamine dans les milieux de culture varie en fonction de l'importance de l'inoculum : si l'inoculum est augmenté de 20 pour cent, la pénicillamine est dosable par la méthode de PAL dès la 20ème heure.

2 - Inoculum constant :

En milieu B.P.G. une suspension bactérienne de 600 M̄ de germes est mise en présence de quantités variables de benzylpénicilline : 2000, 4.000 ou 8.000 unités par ml.

Les dosages de PAL après 24 heures de culture donnent les résultats suivants :

Coli O_{111} B_4 n°3 + 2000 U/ml de péni G. : 28µg par ml de pénicillamine
" + 4000 U/ml " " " 43 " " " " "
" + 8000 U/ml " " " 64 " " " " "

La quantité de pénicillamine produite augmente en fonction de la concentration du milieu en Pénicilline G. D'autre part, en présence de 8.000 unités par ml de pénicilline, la pénicillamine est dosable dans le bouillon de culture à partir de la 8ème heure.

La vitesse d'apparition et la quantité de pénicillamine dépendent donc de l'importance de l'inoculum et de la quantité de substrat mis en présence.

Pour prouver que la pénicillamine est bien un produit de dégradation de la benzylpénicilline, nous avons dosé dans le temps soit par la méthode à l'hydroxylamine, soit par la méthode de SCUDI, les quantités de pénicilline restante à des intervalles de temps réguliers dans un milieu B.P.G. saccharosé à 20 pour cent, ensemencé avec 600 M̄ de germes.

TEMPS	*PENICILLAMINE*	*BENZYLPENICILLINE*	
	Méthode de PAL	*Méthode NH_2 OH*	*Méthode SCUDI*
0	0	1.000	-
6 h	0	880	-
16 h	15	650	-
24 h	35	620	-
28 h	38	600	-
48 h	35	100	110
72 h	10	0	60

Tableau 4 - Production de pénicillamine et dégradation de la Pénicilline G par E. Coli O_{111} B_4 N°3 dans le temps.

Les quantités de pénicillamine et de benzylpénicilline sont exprimées en µg par ml.

Le tableau 4 montre que la pénicillamine n'apparaît pas proportionnellement à la disparition de la pénicilline : si elle est formée rapidement, elle n'est dosable dans le milieu de culture qu'à partir de la 20ème heure.

III. CONCLUSION.

Au cours de l'induction de sphéroplastes pénicilline d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 nous avons observé que la production de pénicillamine était dépendante des conditions opératoires. Un facteur semble particulièrement intéressant, c'est la tonicité du milieu. En effet,quel que soit le milieu de culture, la pénicillamine n'apparaît qu'en milieu hypertonique, atteignant le maximum de production en milieu saccharosé à 20 %. D'autre part, elle est variable en fonction de la composition du milieu de culture et peut être totalement inhibée par un exès d'ions Ca^{++} et Mg^{++} ou une agitation continue du milieu. Enfin, l'apparition de pénicillamine est tardive puisque dans les conditions habituelles de culture le métabolite n'est décelable que vers la 20ème heure. La benzylpénicilline est pourtant dégradée dès les premières heures de culture.

Comme la quantité de pénicillamine produite dépend de la quantité de pénicilline mise en présence et de l'importance de l'inoculum, nous pouvons penser que la formation du produit est le résultat de quelque métabolisme microbien. C'est ce que nous allons essayer de démontrer.

---°---

Chapitre II

PRODUCTION DE PENICILLAMINE A PARTIR DE LA BENZYLPENICILLINE PAR DIVERSES SOUCHES MICROBIENNES

Dans le chapitre précédent, nous avons rapporté que dans les milieux de culture d'*Escherichia coli* O_{111} B_4, au cours de l'induction de sphéroplastes pénicilline, la benzylpénicilline est dégradée en pénicillamine. Ceci nous a amenée à rechercher si ce phénomène est fréquent chez diverses entérobactéries, et si la production de pénicillamine est en rapport avec les diverses enzymes détruisant la Pénicilline G.

I. MATERIEL ET METHODES.

A. LES SOUCHES.

1 - Pour cette expérimentation, nous avons retenu 10 souches d'entérobactéries :

- 3 colibacilles.

Escherichia coli O_{111} B_4 n°3, *Escherichia coli Normaflore* n°20, *Escherichia coli* K_{12} C_{600} λ^- souche non lysogène.

- 4 salmonelles.

Salmonella Ty_2 , *Salmonella typhi murium* n°9, n°61, n°101.

- 1 citrobacter.

Citrobacter n°30.

- 2 klebsielles.

Klebsiella n°5, *Klebsiella aerogenes* 418 qui nous a été adressée par J.M.T. HAMILTON MILLER.

2 à 4 souches diverses ont été sélectionnées.

- 2 pseudomonas.

Pseudomonas aeruginosa n°100 et "LOUMAIGNE"

- 1 staphylocoque doré

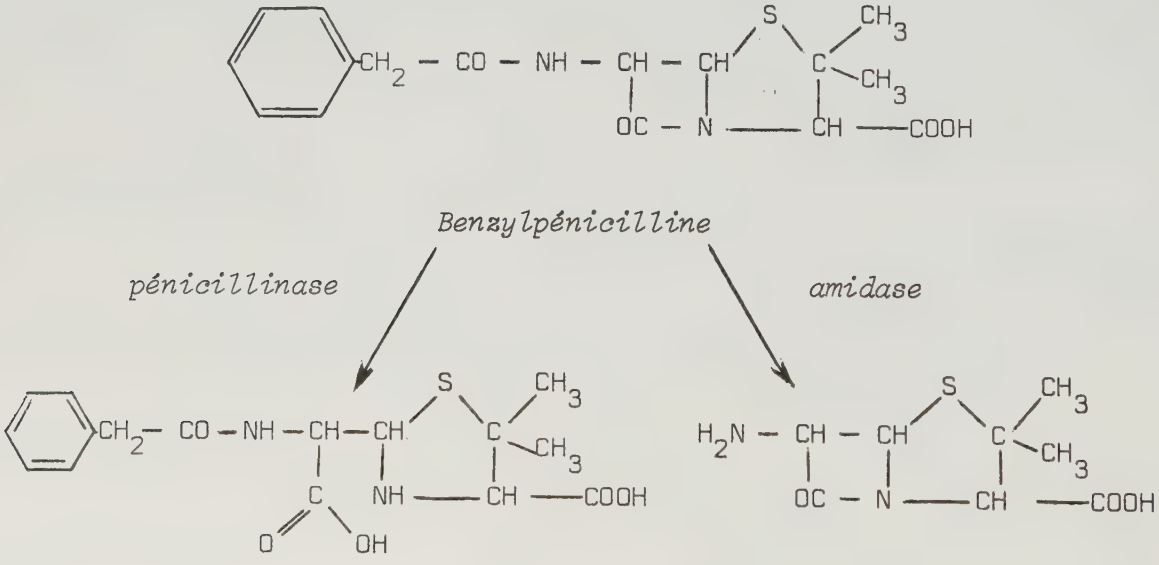
Staphylococcus aureus n°1 B.

Toutes les souches appartiennent à la collection de la faculté de Médecine de Bordeaux.

B. ETUDE DES CARACTERISTIQUES DES SOUCHES.

Les souches ont été choisies en fonction de leurs activités enzymatiques et de leurs caractéristiques à l'égard des antibiotiques.

Deux enzymes sont capables d'inactiver la benzylpénicilline. La β lactamase, appelée autrefois pénicillinase, dégrade spécifiquement la benzylpénicilline en acide benzylpénicilloïque par hydratation de la fonction β lactame. L'acylase, encore dénommée amidase, dégrade la benzylpénicilline en acide 6-amino-pénicillanique et acide benzoïque. Les formules des 3 produits sont les suivantes :



acide benzylpénicilloïque *acide 6 amino pénicillanique*

a) Détermination des β lactamases.

Deux méthodes ont été utilisées, l'une qualitative, l'autre quantitative.

1 - la méthode sur boîte de NOVICK et RICHMOND (166). Elle ne permet de détecter que les activités égale ou supérieures à deux unités par ml.

Les bactéries sont cultivées à 37°C sur une gélose agar 0,3 CY (165) qui n'est pas tamponnée et dont le pH initial est de 7,6 . Après 48 heures d'incubation, les boîtes de Pétri, couvercles ouverts, sont laissées deux heures à l'étude à 37°C. On inonde alors la surface de la gélose avec 1,5 ml d'une solution à 0,25 pour cent (p/v) de N-phényl-1-napthylamine azo-o-carboxybenzène (P.N.C.B.) dans duN, N diméthyl formamide contenant 6 pour cent de Na OH N. Les boîtes sont séchées deux heures à 37°C, puis 1,5 ml d'une solution aqueuse de Pénicilline G sont répandus à la surface de la gélose. L'acide libéré par hydrolyse de la pénicilline fait virer l'indicateur coloré du jaune au violet. Les concentrations de pénicilline utilisées varient avec l'activité pénicillinosique des colonies. Les germes restent viables 6 heures après traitement par l'indicateur.

2 - le dosage a été effectué par la technique de PERRET (178) modifiée par NOVICK (188) à pH = 5,8 pour les staphylocoques et à pH = 7 pour les entérobactéries. L'activité des β lactamases est alors exprimées en unités POLLOCK et TORRIANI (180) (46) : 1 unité correspond à 1 µmole de benzylpénicilline détruite à 30°C en 1 heure.

b) Détermination des acylases.

La recherche des acylases a été faite par J. MOULENE (155) selon la méthode de PRUESS et JOHNSON (183) sur une poudre acétonique de germes.

c) Détermination du comportement des germes à l'égard des antibiotiques.

La sensibilité des souches à la benzylpénicilline a été déterminée par la méthode des dilutions sériées en tubes, en milieu B.P.G. normo et hypertoniques. Les C.M.I. sont exprimées en unités par ml de benzylpénicilline.

C. DOSAGES IODOMETRIQUES DE LA BENZYLPENICILLINE ET DE L'ACIDE PENICILLOIQUE CORRESPONDANT.

a) Dosage de l'acide benzylpénicilloïque.

- *Principe :*

1 mole d'acide benzylpénicilloïque consomme 8-9 équivalents d'iode. De nombreuses méthodes basées sur cette propriété permettent de doser l'acide pénicilloïque, ainsi que la benzylpénicilline, après hydrolyse alcaline ou enzymatique.

PERRET (178) et NOVICK (164) ont mis au point des microdosages basés sur la vitesse de décoloration d'un mélange iode-empois d'amidon, vitesse qui est proportionnelle à la quantité d'acide pénicilloïque apparu dans le temps par hydrolyse enzymatique. Cette technique permet de doser 0,03 mM à 0,6 mM d'acide.

Pour connaître les quantités d'acide benzylpénicilloïque apparues au cours de l'hydrolyse bactérienne des 2,9 mM de pénicilline, (2.000 unités) nous avons utilisé les mêmes réactifs à l'iode que NOVICK mais à des concentrations supérieures. Ne pouvant suivre dans le temps la décoloration à 30°C. au spectrophotomètre, nous avons utilisé le dosage iodométrique en retour, où la quantité d'iode non consommée est dosée par une solution de thiosulfate.

- *Technique :*

Les milieux de culture centrifugés sont traités par 20 ml d'iode 2 mM, 20 minutes à l'obscurité, puis l'iode non consommé est dosé par une solution de thiosulfate 2 mM. L'amidon soluble ou amylodextrine Rhône Poulenc est utilisé pour préparer l'empois d'amidon, car il n'adsorbe pas d'atomes d'iode.

On soustrait de la valeur obtenue directement, celle donnée par des témoins.

1°. un milieu témoin non ensemencé permet d'apprécier la dégradation spontanée de la Pénicilline G dans les mêmes conditions de pH et de température.

2°. un milieu témoin permet d'apprécier la consommation d'iode par les protéines du milieu de culture.

3°. la pénicillamine consomme aussi deux atomes d'iode. Elle est dosée dans les milieux par la méthode de PAL, ce qui permet de corriger cette erreur.

Dans ces conditions, cette technique est précise et donne des résultats reproductibles.

b) Dosage de la benzylpénicilline.

La molécule de benzylpénicilline résiste à l'oxydation à l'iode (72) et n'est pas dosable directement. Mais la benzylpénicilline peut être transformée en acide pénicilloïque, l'hydrolyse se faisant mole à mole.

L'ouverture du pont β lactame est faite :

- soit par voie enzymatique, par addition à 10 ml de milieu de culture de 5.000 unités de Bacto pénase concentrée qu'on laisse agir 1 heure à la température du laboratoire,
- soit par hydrolyse alcaline selon le protocole suivant (87).

A 1 ml de milieu de culture centrifugé, on ajoute 3 ml de NaOH N ; après 10 minutes d'attente, ce mélange est additionné de 6 ml de CH_3COOH N.

Il faut respecter rigoureusement les temps car l'hydrolyse n'est pas totale et faire parallèlement un témoin avec une solution étalon.
1 µmole de benzylpénicilline consomme 7 atomes d'iode.

Ainsi, en faisant deux dosages iodométriques,l'un avant et l'autre après hydrolyse, la différence entre les deux résultats correspond à la quantité de pénicilline présente. La précision est de 10 µ g par ml de benzylpénicilline.

Cette méthode a l'avantage d'être rapide, d'éviter le temps d'extraction de la benzylpénicilline et de pouvoir être faite en série.

II. RESULTATS.

Pour étudier la production de pénicillamine à partir de la benzylpénicilline par diverses souches microbiennes, nous avons classé ces dernières en fonction de leur activité enzymatique.

Le tableau 5 indique que seules deux souches de colibacilles possèdent une acylase et deux souches de Salmonelles sont entièrement dépourvues de β lactamase. Aussi nous envisagerons :

1°. *Les COLIBACILLES* possédant une β lactamase faible et une acylase:*E.coli* O_{111} B_4 n°3 et *normaflore* n°20.

2°. *Les SALMONELLES* qui ne possèdent ni acylase, ni lactamase. *Salmonellae* TY_2 et *typhimurium* n°101

3°. *Les KLEBSIELLES et CITROBACTER* N°30 qui ont de très fortes activités β lactamasiques.

Le tableau 6 indique la sensibilité de diverses souches aux antibiotiques.

A. PRODUCTION DE PENICILLAMINE PAR LES COLIBACILLES.

L'étude de la production de pénicillamine par *Escherichia coli normaflore* n°20 et *Escherichia coli* K_{12} C_{600} a été menée parallèlement à celle de *Escherichia coli* O_{111} B_4. Ces trois souches ont en commun une activité β lactamasique de même importance. L'acylase a été recherchée uniquement dans deux souches.

Cette étude va permettre de préciser si la production de pénicillamine est dépendante de la présence de ces enzymes.

Les conditions opératoires définies précédemment ont été toutes respectées. Si la concentration de Pénicilline G est de 2.000 unités par ml, l'inoculum de 600 M de germes et le milieu ensemencé placé à l'étuve à 37°C, les résultats obtenus sont les suivants :

- en milieu normotonique, il est impossible de mettre en évidence la pénicillamine et ceci pendant 72 heures.

- en milieu hypertonique, les concentrations de pénicillamine dosées sont comparables quel que soit le germe testé, c'est ce que montrent les résultats du tableau 7. Il semble que pour des conditions de culture identiques,tous les colibacilles étudiés dégradent la pénicilline en pénicillamine avec le même rendement.

GERMES		β *LACTAMASE*	*ACYLASE*
E. coli O_{111} B_4	n°3	0,085 U/ml	présence
E. coli Normaflore	n°20	0,085 U/ml	présence
E. coli K_{12}	C 600 λ-	0,085 U/ml	présence
Salmonella Ty_2		0	0
Salmonella typhi murium	n°9	0,02 U/ml	0
" " "	n°101	0	0
" " "	n°61	0,02 U/ml	0
Citrobacter	n°30	0,15 U/ml	0
Klebsiella	n°5	>0,5 U/ml	0
Klebsiella aerogenes 418		0,5 U/ml	0
Staphylococcus aureus 1 B		2 U/ml	0
Pseudomonas	N°100	>2 U/ml	0
Pseudomonas "Loumaigne"		>2 U/ml	0

Tableau 5 - Activité enzymatique des diverses souches.

Les β lactamases sont exprimées en unités de pénicillinase, selon la définition de POLLOCK et TORRIANI.

Germes	Péni G	6 APA Aldrich	Ampicil-line	Diméthoxy	Oxacilline Réni V. Synthécilline
Escherichia coli O_{111} B_4 n°3					
b.n	30 - 15	125-62,5	3,2-1,6	>500	>100
b.s.	60 - 30	>500	15-7,5	>500	>100
Esch.coli Normaflore n°20					
b.n.	60 - 30	125-62,5	15 -7,5	>500	>100
b.s.	125-62,5	>500	250-125	>500	>100
Esch.coli K_{12} C.600					
b.n.	32 - 16	62,5-32	2,5-1,25	16 - 8	>100
b.s.	64 - 32		5 -2,5	2 - 1	>100
Salmonellae typhi Murium n°9					
b.n.	6,2 - 3,2	500-250	1,6-0,8	250-125	> 50
b.s.	7,5 - 3,2	>500	3,2-1,6	500-250	>100
Salmonella Ty_2					
b.n.	6,2 - 3,2	250-125	3,2-1,6	500-250	> 50
b.s.	7,5 - 3,2	>500	6,2-3,2	>500	>100
Citrobacter n°30					
b.n.	2500-1250	250-125	>500	>500	>500
b.s.	5000-2500	>500	>500	>500	>500
Klebsiella n°5					
b.n.	750-375	500-250	>500	>500	>500
b.s.	1500-750	>500	>500	>500	>500
Klebsiella n°418					
b.n.	750-375	>500	>500	>500	>500
b.s.	750-375	>500	>500	>500	>500
Staphylocoque 1 B					
b.n.	5000-2500	-	-	-	-
b.s.	10000-5000	-	-	-	-
Pseudomonas n°100					
b.n.	10.000	-	-	-	-
b.s.	10.000	-	-	-	-
Staphylocoque 209 P	0,05-0,02	30 - 15	0,05-0,02	0,2 - 0,1	-

Tableau 6 - Caractéristiques antibiotiques des diverses souches.

Les résultats sont exprimés en unités par ml pour les concentrations de benzylpénicilline et en µg par ml pour celles des autres pénicillines. Les C.M.I. ont été déterminées en milieu B.P.G. normotonique (b.n.) et B.P.G. saccharosé à 20 % (b.s.)

GERMES	MILIEU HYPERTONIQUE		
	B.P.G.	Penassay	Monod
E. coli O_{111} B_4 n° 3	28	38	20
E. coli normaflore n° 20	28	38	19
E. coli K_{12} n°600	30	40	19

Tableau 7 - Production de pénicillamine par les colibacilles en milieu hypertonique après 24 heures de culture.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml.

Si des milieux B.P.G. hypertoniques sont additionnés de quantités différentes de pénicilline, la production de pénicillamine est variable. Elle augmente en même temps que la quantité de pénicilline et dans le même rapport pour les trois souches. C'est-à-dire que la quantité de pénicillamine produite en présence de 4.000 unités par ml de pénicilline est augmentée de 50 pour cent par rapport à la quantité produite en présence de 2.000 unités par ml. Entre 4.000 et 8.000 unités par ml, le même rapport est observé et cela est vrai pour les trois souches comme le prouvent les résultats résumés dans le tableau suivant: tableau n°8.

GERMES	MILIEU HYPERTONIQUE		
	2000 U/ml Péni G	4000 U/ml	8000 U/ml
E. coli O_{111} B_4 n° 3	28	43	64
E. coli normaflore n°20	28	42	62
E. coli K_{12} n°600	30	46	74

Tableau 8 - Production de pénicillamine par les colibacilles en présence de différentes quantités de benzylpénicilline après 24 heures de culture.

Les quantités de pénicillamine sont exprimés en µg par ml.

Escherichia coli K_{12} C 600 semble donner des quantités de pénicillamine légèrement supérieures aux autres souches, quelles que soient les quantités de Pénicilline G présentes.

La présence de fortes concentrations de pénicilline favorise l'apparition plus précoce de la pénicillamine dans les milieux de culture. En présence de 8.000 unités par ml de benzylpénicilline, la pénicillamine apparaît dès la 12ème heure dans les trois hydrolysats.

Cette étude nous entraîne à conclure que trois germes ayant des sensibilités à la benzylpénicilline égales, et ayant une activité enzymatique identique, sont capables dans les mêmes conditions opératoires et à partir de la même concentration de pénicilline, de produire de la pénicillamine dans le même temps et avec des rendements très comparables.

B. PRODUCTION DE PENICILLAMINE PAR LES SALMONELLES.

Deux souches de Salmonelles sont étudiées ici car seules *Salmonella* Ty_2 et *Salmonella typhi murium* n°101 semblent, selon la méthode de NOVICK, dépourvues de β lactamase; donc en principe, si la benzylpénicilline est dégradée par ces souches, elle ne doit jamais être transformée en acide benzylpénicilloïque. Par dosage iodométrique, nous avons recherché dans chaque échantillon la quantité de pénicilline dégradée dans le temps et vérifié qu'il n'y a pas formation d'acide pénicilloïque.

1 - Dosage de la benzylpénicilline et de l'acide benzylpénicilloïque.

Si la culture est faite à 37°C, à partir d'un inoculum de 600 $\bar{M}$ de germes par ml, et en présence de 2.000 unités par ml, soit 2,9 µmoles de benzylpénicilline, les dosages iodométriques ont montré que :

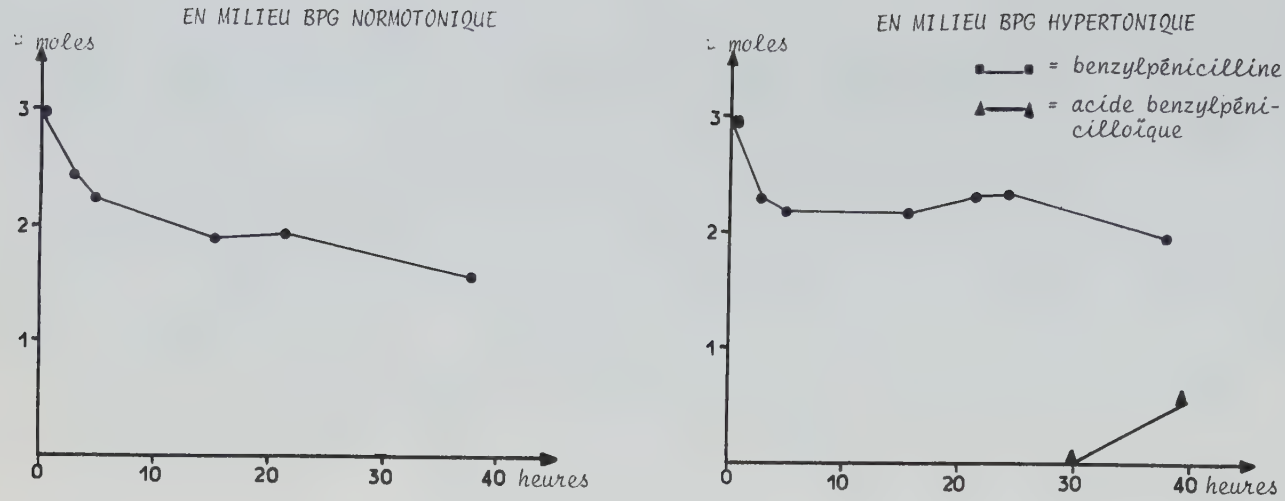
a) en milieu normotonique, *Salmonella* Ty_2 dégrade très lentement 2,9 µmoles de pénicilline. Au bout de trois heures, 2,26 µmoles restent intactes, 2,16 µmoles au bout de 5 heures, 2,10 au bout de 15 h 30. Des traces d'acide pénicilloïque ne sont dosables qu'à la 38ème heure.

b) en milieu hypertonique, la dégradation est légèrement plus lente dans les premières heures, mais les résultats sont comparables comme le montrent les deux courbes (figure 4a).

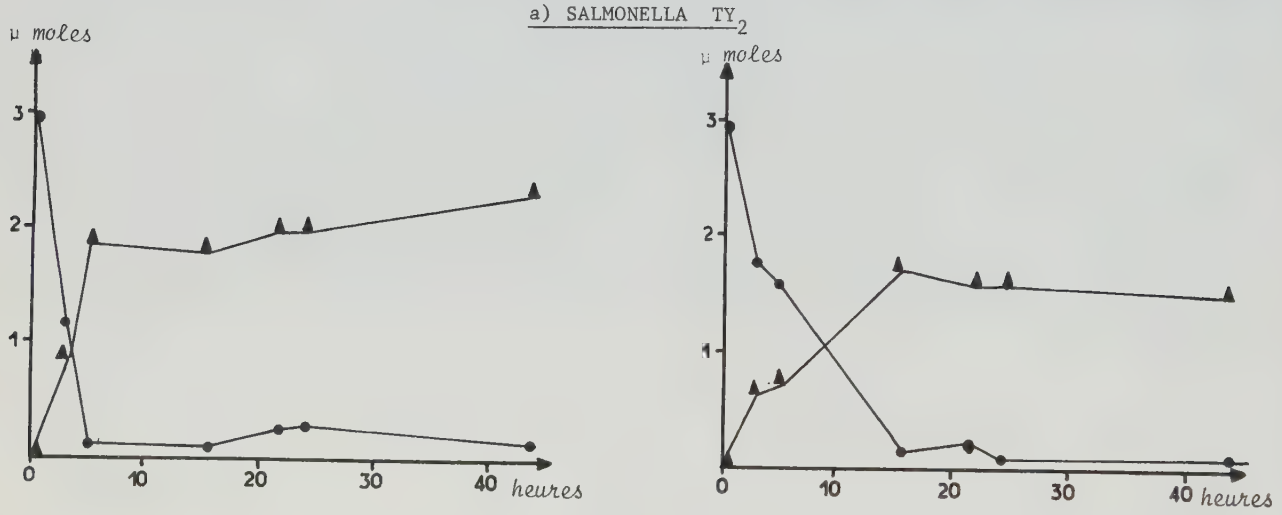
Donc, on peut affirmer que dans les 24 premières heures de culture, nulle trace d'acide pénicilloïque n'est présente dans les milieux de culture.

2 - Dosages de la pénicillamine.

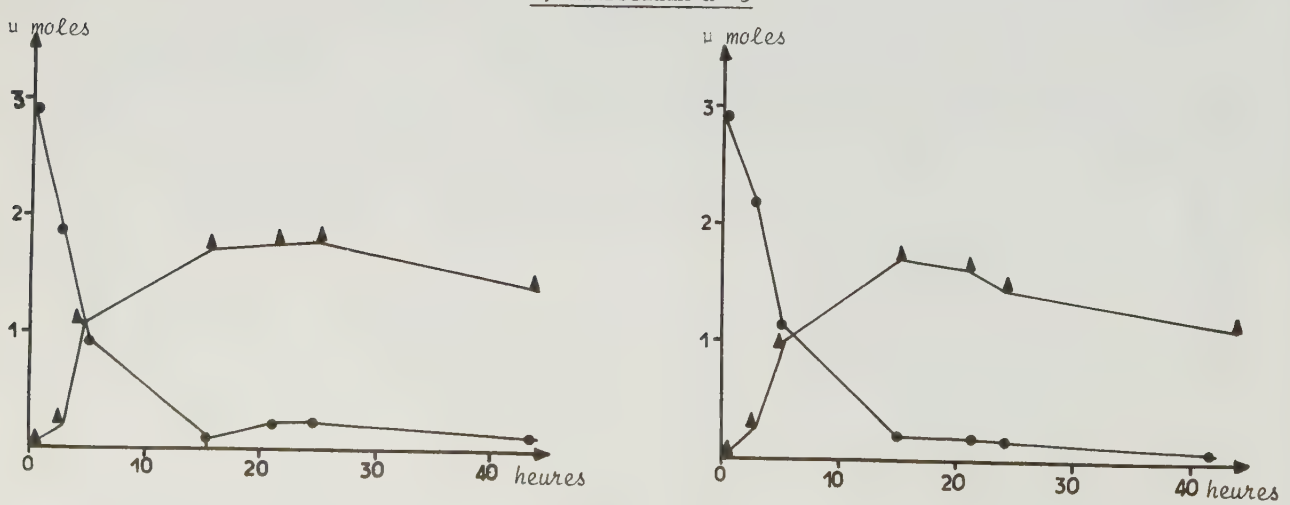
Dans les mêmes conditions de culture, en milieu isotonique quels que soient l'heure du dosage et le milieu de culture choisi, la production de pénicillamine est nulle. En milieu hypertonique, elle est



a) SALMONELLA TY_2



b) KLEBSIELLA n° 5



c) KLEBSIELLA 418

DEGRADATION DE LA BENZYLPENICILLINE EN ACIDE BENZYLPENICILLOÏQUE
EN FONCTION DU TEMPS PAR DIVERSES SOUCHES

FIGURE 4

positive en milieu B.P.G. et Penassay et le tableau 9 présente les résultats obtenus après centrifugation des milieux.

GERMES	MILIEU HYPERTONIQUE		
	B.P.G.	Penassay	Monod
Salmonella Ty_2	18	27	0
Salmonella typhi murium			
N° 9	10	0	0
N°61	10	0	0
N°101	10	10	0

Tableau 9 - Production de pénicillamine par les salmonelles en milieu hypertonique après 24 heures de culture.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml.

Les quantités de pénicillamine dosées dans les milieux de culture de *Salmonella* Ty_2 sont assez comparables à celles dosées dans ceux d'*Escherichia coli* après centrifugation des germes. *Salmonella* Ty_2 en produit davantage en milieu Penassay qu'en milieu B.P.G. *Salmonella typhi murium* en donne des quantités qui sont à la limite de sensibilité du dosage de PAL. Par contre, en milieu synthétique de MONOD, aucune salmonelle ne produit de pénicillamine.

Si l'inoculum varie entre 50 $\bar{M}$ et 600 $\bar{M}$ de germes, et si les dosages sont effectués directement sur les suspensions bactériennes, la dégradation de 2.000 unités par ml de pénicilline est dépendante du nombre de germes comme le prouvent les résultats suivants : tableau 10.

GERMES	50 $\bar{M}$	100 $\bar{M}$	150 $\bar{M}$	200 $\bar{M}$	400 $\bar{M}$	600 $\bar{M}$
Salmonella Ty_2	10	10	12	17	24	28

Tableau 10 - Production de pénicillamine par les salmonelles en fonction de l'inoculum après 24 heures de culture.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml.

Si l'on porte sur un graphique la quantité de pénicillamine produite par rapport au nombre de germes (figure 5), la courbe obtenue tend vers un plateau. Une courbe semblable (figure 6) est obtenue si on maintient l'inoculum fixe (600 M̄ de germes) et si ce sont les quantités de pénicilline introduites dans le milieu qui varient entre 500 et 12.000 µg/ml. Il semble que dans les deux cas, il y ait une limite imposée par la quantité de substrat ou le nombre de germes. C'est ce que montre le tableau 11.

GERMES	*1000 U.*	*2000 U.*	*3000 U.*	*4000 U.*	*8000 U.*	*12000 U.*	*16000 U.*	*24000 U.*
Salmonella Ty_2	10	20	30	35	46	49	55	56

Tableau 11 - Production de pénicillamine par salmonella Ty_2 en fonction des quantités de benzylpénicilline, après 24 heures de culture.

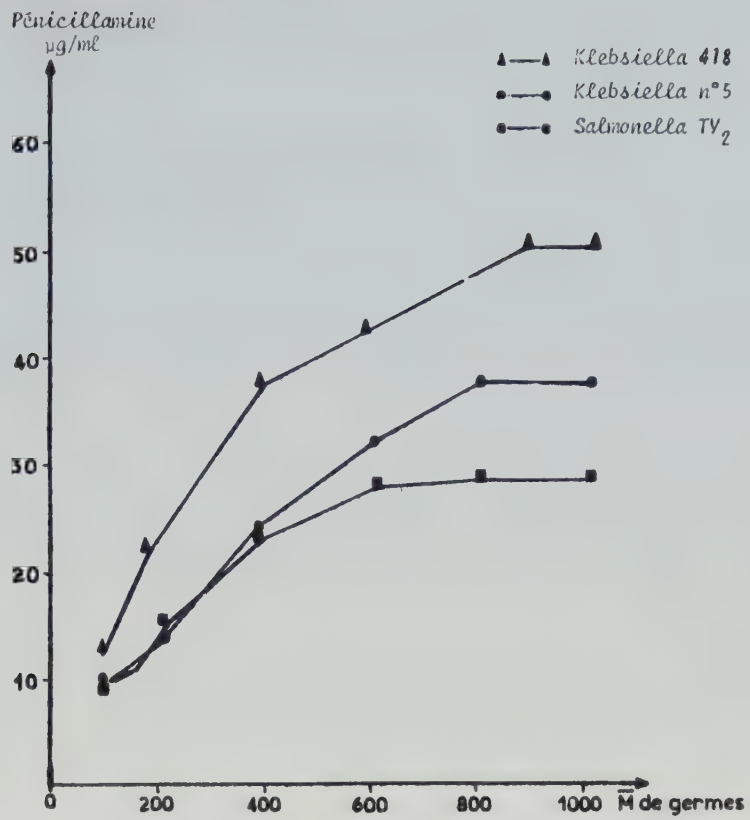
Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml.

L'étude des salmonelles, et plus particulièrement de *Salmonella* Ty_2 permet de conclure que la tonicité du milieu n'influence pas la dégradation des pénicillines. D'autre part, la production de pénicillamine peut être nulle en milieu saccharosé lorsqu'il est synthétique (milieu de Monod).

Il est à noter que la pénicillamine est dosable, dans le milieu de culture, dès la 20ème heure alors que l'acide pénicilloïque ne l'est que vers la 38ème heure. Ceci permet de penser que l'acide pénicilloïque n'est pas un intermédiaire indispensable à la production de pénicillamine. Comme cet acide est produit sous l'influence d'une β lactamase, nous pouvons en conclure qu'il n'y a pas de rapports entre la formation de pénicillamine et la présence d'une β lactamase.

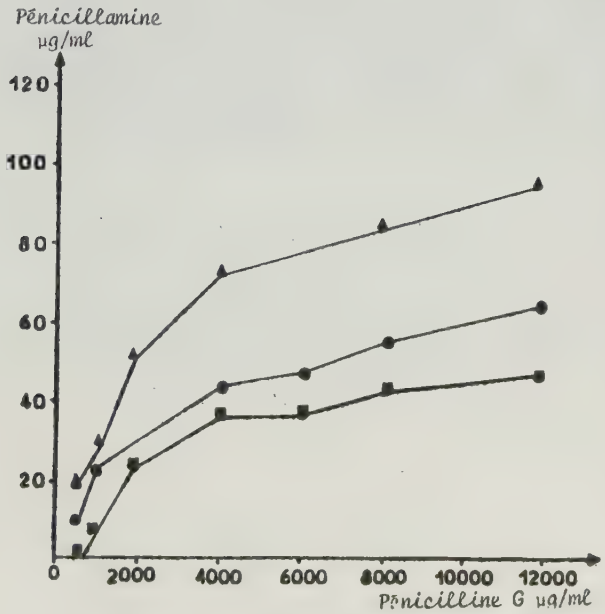
C. PRODUCTION DE PENICILLAMINE PAR UN CITROBACTER ET DEUX KLEBSIELLES.

Trois souches, *Citrobacter* n°30 et *Klebsiellae* n°5 et 418 peuvent être comparées, car, dépourvues d'acylase, elles possèdent une activité pénicillinasique très forte pour *Klebsiellae* n°5 et 418 et forte pour *Citrobacter* n°30. Donc, à l'opposé des Salmonelles, ces souches doivent dégrader rapidement la benzylpénicilline en acide pénicilloïque. Elles vont donc permettre de déterminer si la présence de cet acide a



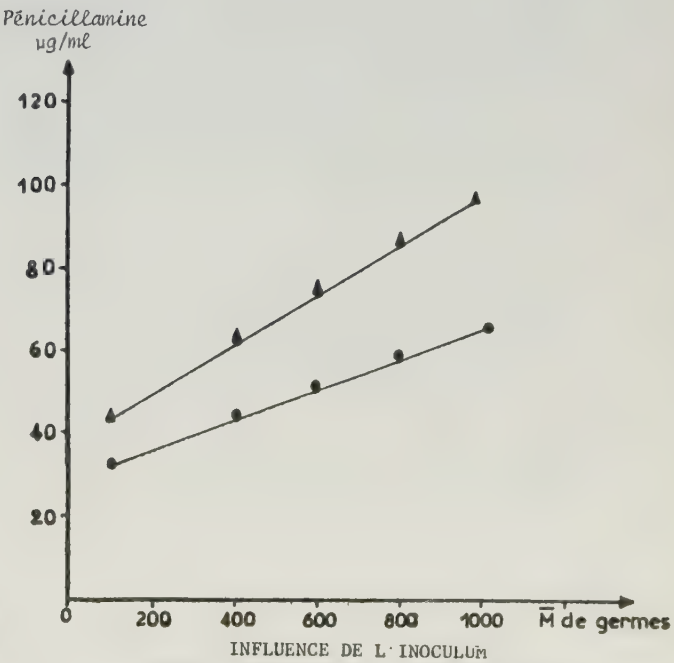
INFLUENCE DE L'INOCULUM SUR LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE
1000 µg/ml de PENICILLINE G - MILIEU BPG HYPERTONIQUE

FIGURE 5



INFLUENCE DE LA QUANTITE DE PENICILLINE G
SUR LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE
L'inoculum est de 600 M de germes

FIGURE 6



INFLUENCE DE L'INOCULUM
SUR LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE
5.000 µg/ml de Pénicilline G
Milieu BPG hypertonique

FIGURE 7

une influence sur la production de pénicillamine. Comme précédemment, nous allons faire à des temps donnés les dosages simultanés de la benzylpénicilline, de l'acide pénicilloïque et de la pénicillamine.

1 - Dosages de la pénicilline et de l'acide pénicilloïque.

600 M de germes sont introduits dans des milieux B.P.G. normo et hypertoniques contenant 2,9 µmoles de Pénicilline G par ml.

a) Klebsiella n°5.

- en milieu isotonique les 2,9 µmoles de pénicilline sont dégradées en 5 heures, mais 1,96 µmoles d'acide pénicilloïque seulement sont décelables. Donc, la pénicilline est soit masquée, soit dégradée sous une autre forme. Après 24 heures de culture, les quantités d'acide pénicilloïque évoluent peu.

- en milieu hypertonique, la dégradation est beaucoup plus lente. Au bout de 5 heures, il reste 1,6 µmoles de pénicilline et 0,68 µ moles d'acide pénicilloïque seulement sont dosables. Il faudra attendre 15 heures pour obtenir le taux d'acide pénicilloïque obtenu en 5 heures en milieu isotonique (figure 4b).

b) Klebsiella 418.

- en milieu isotonique la pénicilline est dégradée plus faiblement. Au bout de 3 heures, il en reste 1,96 µmoles, au bout de 5 heures 0,9 µ moles, et au bout de 15 heures 0,14 µ moles. L'acide pénicilloïque apparaît dès la 3ème heure, et à la 15ème heure nous dosons 1,70 µ moles.

- en milieu hypertonique, comme le montre le diagramme suivant, la dégradation de la pénicilline est plus lente, cependant les taux d'acide pénicilloïque obtenus sont comparables (figure 4 c).

2 - Dosages de pénicillamine.

- En milieu isotonique, avec Klebsiella n°5, dans les mêmes conditions opératoires, on assiste à la dégradation rapide de la Pénicilline G en acide pénicilloïque, et à l'apparition tardive de la pénicillamine puisqu'il faut attendre 24 heures pour avoir un dosage de PAL positif. Avec Klebsiella 418, la formation d'acide pénicilloïque est un peu moins rapide que précédemment mais la production de pénicillamine est nulle, comme le montre le tableau 12.

(voir tableau page suivante).

GERMES	B.P.G. ISOTONIQUE			B.P.G. HYPERTONIQUE		
	24 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.
Citrobacter n°30	12	19	10	21	28	32
Klebsiella n° 5	15	25	10	35	52	46
Klebsiella 418	0	0	0	42	59	58

Tableau 12 - Production de pénicillamine en fonction du temps par citrobacter n°30 et Klebsiella n°5 et n°418 en B.P.G. isotonique et hypertonique.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml.

Donc l'apparition de pénicillamine ne semble pas liée à la présence d'acide pénicilloïque.

- En milieu hypertonique, les quantités de pénicillamine dosées sont élevées et les deux klebsielles qui ont la plus grande activité pénicillinasique donnent les meilleurs rendements obtenus jusqu'à présent, soit de 52 à 59 µ g par ml dans les bouillons centrigugés (tableau 12). Klebsiella 418 produit dans ces conditions plus de pénicillamine que Klebsiella n°5. Le rôle de l'acide pénicilloïque semble complexe et peut-être secondaire.

En milieu de MONOD, saccharosé à 20 pour cent, Klebsiella 418 donne des dosages de PAL positifs et c'est la souche qui dans ces conditions de culture et de milieu donne le meilleur rendement (34 µg par ml de pénicillamine). C'est pour cela que ce germe cultivé dans ce milieu synthétique a été utilisé pour obtenir de la pénicillamine pure résultant d'une hydrolyse bactérienne.

3 - Influence de l'inoculum et de la quantité de benzylpénicilline.

L'étude a été faite avec les *Klebsiella* n° 5 et 418 en milieu B.P.G. saccharosé à 20 pour cent.

a) Inoculum variable et 2.000 unités par ml de benzylpénicilline.

- soit un inoculum variable mis en présence de 2.000 unités par ml de benzylpénicilline. Il est constitué par une suspension de

germes obtenus par culture agitée de 4 heures en milieu B.P.G. Les inoculums varient entre 50 M̄ et 1.000 M̄ de germes par ml. Après 24 heures de culture à 37°C., le dosage de pénicillamine revèle :

a) que la quantité de pénicillamine produite augmente rapidement et proportionnellement en fonction de l'importance de l'inoculum. Cela a été constaté pour tous les germes.

b) lorsque l'inoculum atteint ou dépasse le taux de 800 M̄ de germes par ml, les quantités de pénicillamine produites tendent vers un maximum comme si la production était limitée par la quantité de pénicilline. La souche *Klebsiella* n°5 semble atteindre ce plateau plus rapidement, c'est-à-dire avec un inoculum plus faible que *Klebsiella 418*. Celles de *Salmonella* Ty_2 l'atteignaient avec un inoculum de 600 M̄ de germes.

Tous les dosages sont rapportés dans la figure 5. La production de pénicillamine paraît bien dépendante du nombre de germes.

b) Inoculum variable et 5.000 unités par ml de benzylpénicilline.

- soit un inoculum variable en présence de 5.000 unités par ml de benzylpénicilline.

La densité de l'inoculum augmente aussi le rendement en pénicillamine. Cependant, en présence d'une forte densité microbienne, la production de pénicillamine n'est pas limitée et augmente constamment. Le plateau terminal disparaît. Tout se passe comme si dans le premier cas la production de pénicillamine avait été arrêtée par une disparition rapide du substrat. Au contraire, dans le deuxième cas, le substrat est en excès et la quantité de pénicillamine produite continue à augmenter.

La figure 7 présente les résultats.

c) Inoculum fixe et quantité variable de benzylpénicilline.

L'inoculum est de 600 M̄ de germes. Dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, mais en faisant varier les concentrations de benzylpénicilline de 500 à 12.000 µg/ml, le dosage de pénicillamine révèle que :

a - la quantité de pénicillamine produite augmente rapidement en fonction de la concentration du milieu en pénicilline jusqu'à un taux voisin de 8.000 unités par ml. Ceci a été observé avec toutes les souches.

b - mais, lorsque la concentration en pénicilline augmente, l'augmentation du taux de pénicillamine ralentit et tend aussi vers un plateau. La limite semble alors imposée par le nombre de germes présents. Tous ces résultats sont présentés dans la figure 6.

Il semble que la production de pénicillamine soit variable en fonction du taux de pénicilline présent ou plus probablement de la quantité de pénicilline dégradée. Ce problème sera étudié ultérieurement.

En présence de 8.000 unités par ml de pénicilline, les deux Klebsielles produisent des quantités de pénicillamine dosables dans les milieux de culture dès la 6ème heure. Par exemple, en milieu B.P.G. saccharosé à 20 pour cent, les résultats sont les suivants :

Klebsiella n°5 21 µg par ml
Klebsiella 418 24 µg par ml

En résumé, la production de pénicillamine est très étroitement liée au nombre de germes et à la quantité de substrat proposée. Elle ne semble pas dépendre étroitement de la présence d'une β lactamase. Pourtant les souches qui donnent les meilleurs rendements en pénicillamine sont celles qui possèdent la plus forte activité pénicillinasique.

α - *L'étude du staphylocoque doré I B.*

Pour savoir si ce phénomène était général ou propre aux entérobactéries, nous avons étudié d'autres souches dans les mêmes conditions opératoires. Nous avons choisi par la méthode sur boîtes de Novick le staphylocoque doré I.B. ayant une β lactamase très active et supérieure à deux unités par ml. Cette souche a une activité pénicillinasique quatre fois supérieure à celle de *Klebsiella* n°5.

Or, en milieu B.P.G. saccharosé à 20 pour cent, en utilisant un inoculum de 600 M̄ de germes et 2.000 unités par ml de pénicilline, le dosage de pénicillamine donne les résultats suivants (tableau 13). La production de pénicillamine est nulle en milieu isotonique, elle atteint 72 µ g par ml en milieu hypertonique après 48 heures de culture. La production de pénicillamine n'est donc pas multipliée par 4. Elle est seulement supérieure aux quantités produites par *Klebsiella* 418.

GERMES		*B.P.G. ISOTONIQUE*	*B.P.G. HYPERTONIQUE*
Staphylocoque I.B.	24 h.	0	55
	48 h.	0	72

Tableau 13 - Production de pénicillamine par staphylococcus aureus I.B. en bouillon B.P.G. iso et hypertonique.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml.

Il semble donc que ces deux éléments, présence d'acide benzylpénicilloïque et production de pénicillamine, soient liés mais non dépendants l'un de l'autre. C'est ce que nous a permis de conclure l'étude de deux souches de pyocyaniques qui possèdent des β lactamases constitutives.

β - *Etude des pyocyaniques :*

Pseudomonas aeruginosa n°100 ne peut pas, quelles que soient les conditions de culture, dégrader 2.000 unités par ml de pénicilline en pénicillamine. Par contre, le pyocyanique "Loumaigne" produit, en milieu B.P.G. hypertonique, 38 µ g par ml de pénicillamine au bout de 24 heures. Ces deux souches ayant des caractères enzymatiques identiques produisent des quantités différentes de pénicillamine, ce qui laisse supposer que la production de pénicillamine est une caractéristique d'une souche, vraisemblablement due à une activité enzymatique.

III. CONCLUSION.

Diverses souches de germes à Gram + et à Gram - sont capables d'hydrolyser la benzylpénicilline en pénicillamine.Cette étude nous a permis d'observer que :

1 - des germes dépourvus d'acylase produisent de la pénicillamine,

2 - des germes dépourvus de β lactamase comme les salmonelles, produisent de la pénicillamine.

Donc, il semble que la production de pénicillamine semble être indépendante de la vitesse de dégradation de la benzylpénicilline en acide pénicilloïque et en 6 APA.

3 - des germes possédant des activités β lactamasiques importantes ne produisent pas obligatoirement de la pénicillamine. Le *Pseudomonas aeruginosa* n° 100 n'en produit pas quelles que soient les conditions de culture. Pourtant, *Klebsiella* n° 5 et *Klebsiella* 418 sont en milieu hypertonique les meilleurs producteurs parmi les entérobactéries ,et le staphylocoque doré qui a la plus forte activité β lactamasique atteint le taux le plus élevé. La formation précoce d'acide pénicilloïque dans les milieux de culture peut jouer un rôle secondaire dans la production de pénicillamine.

4 - la production de pénicillamine est beaucoup plus fréquente en milieu hypertonique qu'en milieu isotonique. Ceci peut être dû soit au nombre de germes, soit à la quantité de pénicilline présente.

a - le nombre de germes.

En milieu hypertonique, on pourrait admettre que la production de pénicillamine est plus importante car dans ces conditions, le nombre de survivants est supérieur. De même, on pourrait admettre qu'elle est toujours négative dans les milieux isotoniques ensemencés soit par des *Escherichia coli*, soit par des salmonelles,parce que dans ces conditions,

les souches sont sensibles à la benzylpénicilline ; au contraire, elle serait positive dans les milieux ensemencés par *Citrobacter* n°30 et *Klebsiella* n°5 parce que ces germes ont des C.M.I. très élevées.

Mais l'apparition de pénicillamine ne dépend pas que de ce paramètre car les C.M.I. en milieu isotonique de *Klebsiella* 418 et de *Staphylococcus aureus* sont égales ou supérieures à celles de *Klebsiella* n°5; or, les recherches de pénicillamine sont dans ces cas-là toujours négatives.

b - la quantité de pénicilline :

La dégradation de la benzylpénicilline en pénicillamine ne semble pas exiger le stade acide pénicilloïque. On peut donc admettre une dégradation directe benzylpénicilline → pénicillamine. Les dosages iodométriques montrent que pour une souche donnée, la dégradation de la benzylpénicilline en acide pénicilloïque est plus rapide en milieu isotonique qu'en milieu hypertonique. Donc la quantité de pénicilline susceptible d'être dégradée en pénicillamine est plus importante en milieu hypertonique qu'en milieu isotonique.

Ceci pourrait expliquer pourquoi les quantités de pénicillamine dosées en milieu hypertonique sont systématiquement supérieures à celles dosées en milieu isotonique. Mais l'hypothèse ne peut pas expliquer pourquoi dans les milieux normotoniques de *Klebsiella* 418, il n'y a jamais formation de pénicillamine. Les quantités de pénicilline restantes sont pourtant supérieures dans ces milieux à celles restantes dans les milieux de *Klebsiella* n°5.

Aussi les quantités de pénicillamine produites, bien que très dépendantes et du nombre de germes et de la quantité de substrat, sont variables selon les souches. Elles sont probablement dues à un processus enzymatique indépendant et des β lactamases et des acylases.

---°---

Chapitre III

PRODUCTION DE PENICILLAMINE PAR DIVERSES SOUCHES MICROBIENNES A PARTIR DE DIVERSES PENICILLINES ET DE LEURS DERIVES.

Après avoir étudié la production de pénicillamine par différents germes à partir de la Pénicilline G, nous avons essayé de préciser si l'apparition de ce métabolite se faisait de manière identique à partir de diverses pénicillines naturelles et semi-synthétiques.

I. MATERIEL ET METHODES.

Nous avons utilisé diverses pénicillines et quelques acides pénicilloïques correspondants.

A. LES PENICILLINES.

- des pénicillines sensibles à la β lactamase des germes à Gram + et Gram -
  - ampicilline
  - synthécilline
- des pénicillines insensibles à la β lactamase ou tout au moins plus résistantes.
  - diméthoxy pénicilline
  - oxacilline
- des pénicillines stables en milieu acide
  - ampicilline
  - oxacilline
  - pénicilline V
  - hétacilline.

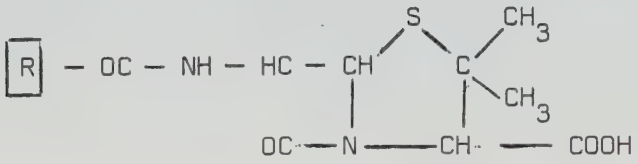
- une pénicilline instable à pH acide

  - la diméthoxy pénicilline

- le noyau 6-amino-pénicillanique.

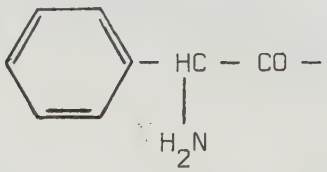
Toutes ces pénicillines diffèrent de la benzylpénicilline uniquement par la nature chimique de leur chaîne latérale.

Schéma des pénicillines :



1) *Ampicilline* ou D (-) α amino benzylpénicilline. (Bristol lot n°62 F 2.346)

La chaîne latérale est la suivante :

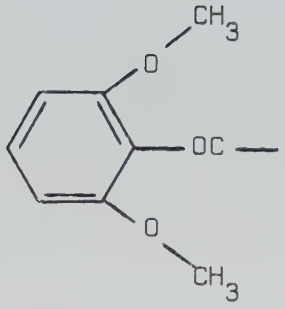


Cette pénicilline a été découverte par les chercheurs des Beecham Research Laboratories. Elle est particulièrement sensible aux β lactamases des germes à Gram + . Elle est stable à pH acide et son activité antibiotique est très prononcée chez les entérobactéries.

2) *Methicilline* ou 2-6 diméthoxy-pénicillinate de sodium (Bristol lot n°48, titrant 866 µg par ml).

La chaîne latérale est la suivante :

(voir schéma page suivante).

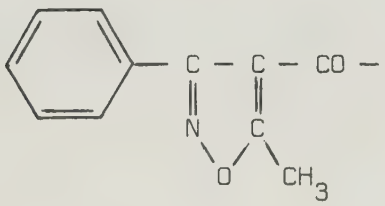


Cette pénicilline est instable en milieu acide. Conservée à 25°C à pH = 2, elle perd environ 50 pour cent de son activité en 20 minutes (ROLINSON et coll.).

D'après ACRED (1), elle présente le grand avantage de résister à la dégradation de la β lactamase du staphylocoque, aussi est-elle spécifiquement utilisée comme inducteur de cette enzyme. Pourtant, KNOX (123) a montré que cette pénicilline pouvait être lentement attaquée par la β lactamase du staphylocoque et plus fortement encore par celle du *Bacillus cereus* et des entérobactéries.

3) *Oxacilline* ou méthyl-5-phényl-3-isoxazolyl-4-pénicillinate de sodium (Bristol, lot K 1424, titrant 870 µg par ml, lot 10.100 34 titrant 905 µ g par ml).

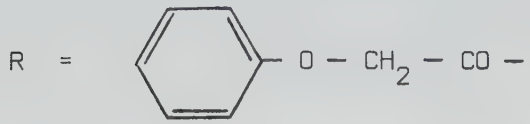
La chaîne latérale de la molécule est la suivante :



Cette pénicilline résiste aussi bien aux pH acides comme l'a montré DOYLE (51) qu'aux pénicillinases bactériennes, comme l'a montré GOUREVITCH (88).

4) *Pénicilline V* ou pnénoxy méthyl pénicilline.

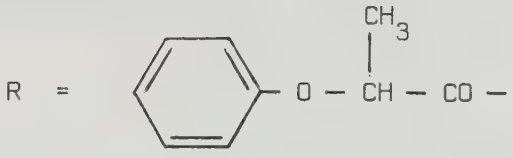
Echantillon des laboratoires Rhône Poulenc lot 47. La chaîne latérale est la suivante :



C'est une pénicilline naturelle obtenue par fermentation des pénicilliums. Elle est stable en milieu acide.

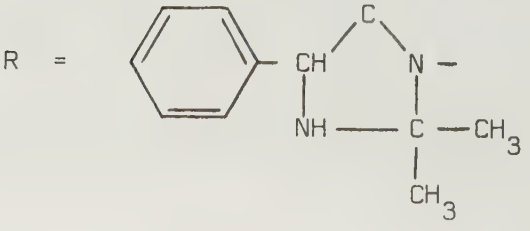
5) *Synthecilline* ou d N-phénoxy-2'-propionyl-6-amino-6-pénicillinate de sodium
(Bristol lot B.0289 : produit pur et lot 117 titrant 472 µg par ml).

La chaîne latérale est la suivante :



Cette pénicilline est sensible à la β lactamase des germes à Gram +.

6) *Hétacilline* ou acide diméthyl-2-2-oxo-5-phényl-4-amidazolidinyl-1-6-diméthyl-3-3-oxo-7-thio-4-aza-bicyclo-3-2-0-heptane-carboxylique-2.



Cette pénicilline est soluble à pH neutre ou fortement acide. Sa stabilité vis-à-vis des acides est supérieure à celle de l'ampicilline.

Sa liaison aux protéines plasmatiques est inférieure à 20 pour cent.

7) Le noyau 6-amino-pénicillanique ou 6 APA.

(Aldrich lots A 70 90 - 073.191 - 100.361, Bristol lot n°3460, Sigma 44 B 1550).

C'est le noyau commun de toutes les pénicillines, mis en évidence par BATCHELOR, DOYLE, NOYLER et ROLINSON (15). Le pont β lactamase de ce noyau est hydrolysé plus lentement que celui de la benzylpénicilline par les β lactames des germes à Gram +. Des solutions riches en glucose inhibent en partie cette hydrolyse. Cet effet serait très dépendant du pH.

Le 6 APA est structuralement incapable de réarrangement en acide pénicillénique intermédiaire.

B. LES ACIDES PENICILLOIQUES.

- Acide benzylpénicilloïque,
- Acide 6-amino-pénicilloïque.

La rupture du pont β lactame des pénicillines peut être faite de différentes manières (41).

- par hydrolyse alcaline, catalysée par les ions Cu^{++}, SO_3^{--} ou SO_3H^-
- par alcoolyse, catalysée aussi par les ions Cu^{++} et Zn^{++}
- par aminolyse
- par traitement à la cystéine,
- par traitement à la β lactamase de bacillus cereus (bacto Penase DIFCO) qui hydrolyse toutes les pénicillines même la méthicilline.

C. METHODES D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGES.

Toutes les méthodes utilisées précédemment pour la benzylpénicilline et ses dérivés sont valables pour tous les substrats. La méthode iodométrique sera la plus volontiers utilisée car elle est sensible et évite les problèmes d'extraction que posent l'ampicilline et le 6 APA insolublesdans l'acétate d'isoamyle.

L'acide 6-amino-pénicillanique consomme 12 atomes d'iode
L'acide diméthoxy pénicilloïque consomme 10 " "
L'acide NH_2 benzylpénicilloïque consomme 8 " "

Les quantités de pénicilline introduites dans les milieux de culture sont moléculairement équivalentes à 2.000 unités par ml de benzylpénicilline.

II. RESULTATS.

A. LES PENICILLINES.

Les quantités de pénicillamine dosées dans les différents milieux de culture, permettent de présenter les résultats en groupant plusieurs substrats.

Les conditions opératoires établies pour l'étude de la dégradation bactérienne de la benzylpénicilline sont rigoureusement maintenues.

- le milieu utilisé est uniquement le B.P.G.
- l'inoculum est de 600 M de germes,
- la pénicilline est en poids moléculaire, équivalente à 2.000 unités par ml de benzylpénicilline, soit 2,9 µmoles/ml.
- tous les dosages ont été effectués sur des milieux centrifugés.

1. *Dégradation de l'ampicilline et de la synthécilline en pénicillamine.*

L'étude de la dégradation de l'ampicilline est rendue difficile par la sensibilité de la plupart des souches d'entérobactéries à cette pénicilline.

Les colibacilles et les salmonelles ont dû être repiqués successivement dans des milieux contenant l'antibiotique, pour leur permettre de pousser dans les conditions nécessaires à la production de pénicillamine.

Au contraire, les Klebsielles et les autres germes sont plus résistants et poussent facilement en présence d'ampicilline (tableau 6).

a) *Production de pénicillamine à partir de l'ampicilline par les diverses entérobactéries.*

Les différents résultats sont groupés dans le tableau 14. (voir tableau page suivante).

1- Etude de Klebsiella n°5.

La souche dégrade l'ampicilline en pénicillamine de manière identique à la benzylpénicilline, c'est-à-dire faiblement en milieu isotonique, fortement en milieu hypertonique puisque les quantités sont de 50 µg par ml.

GERMES		AMPICILLINE		SYNTHECILLINE	
		B.P.G.	B.P.G. hypertonique	B.P.G.	B.P.G. hypertonique
Klebsiella n°5	24 h	15	24	0	20
	48 h	10	47	0	28
	72 h	0	50	0	35
Klebsiella aerogenes 418	24 h	0	30	0	19
	48h	0	40	0	22
	72 h	0	43	0	24
Salmonella typhi murium n°103	24 h	10	25	10	25
	48 h	15	30	10	25
	72 h	10	23	10	30
Salmonella Ty_2	24 h	0	12	10	15
	48 h	0	14	0	10
	72 h	0	27	0	0
Citrobacter n°30	24 h	0	12	0	10
	48 h	0	15	0	26
	72 h	0	20	0	30
E. coli O_{111} B_4 n°3	24 h	0	10	0	25
	48 h	0	10	0	24
	72 h	0	0	0	18
E. coli normaflore n°20	24 h	0	17	0	25
	48 h	0	17	0	18
	72 h	0	23	0	0

Tableau 14 - Production de pénicillamine par diverses souches à partir de l'ampicilline et de la synthécilline.

Les résultats sont exprimés en µg par ml.

Nous avons voulu préciser si un même germe, donnant une production de pénicillamine comparable à partir de deux substrats différents, est capable de produire les mêmes quantités d'acide pénicilloïque avec la même rapidité.

D'après la figure 8a, il apparaît que l'ampicilline est dégradée plus lentement que la benzylpénicilline, quelle que soit la tonicité du milieu,et que les quantités d'acide pénicilloïque formées sont inférieures. Après 20 heures de culture en milieu hypertonique, il y a 1,10 µmoles d'acide α NH_2 benzylpénicilloïque formé alors que 1,70 µmoles d'acide benzylpénicilloïque sont formées au bout de 15 h 30. Le phénomène est encore plus net en milieu isotonique.

Il semble que nous puissions à nouveau conclure que la production de pénicillamine n'est pas influencée par la vitesse d'hydrolyse de la pénicilline en acide pénicilloïque correspondant.

2- Etude de Klebsiella 418.

Cette souche dégrade l'ampicilline en pénicillamine, comme la benzylpénicilline, c'est-à-dire avec des rendements comparables uniquement en milieu hypertonique. Les dosages iodométriques montrent que les quantités d'acide αNH_2 benzylpénicilloïque formées après 24 heures de culture dans les hydrolysats normotoniques de *Klebsiella* n°5 et de *Klebsiella* 418 sont identiques (figure 8). Pourtant *Klebsiella* 418 produit des quantités de pénicillamine supérieures à *Klebsiella* n°5. Donc la production de pénicillamine semble vraiment indépendante de l'apparition de ce métabolite.

3- Les salmonelles.

A partir de l'ampicilline, les salmonelles produisent différemment de la pénicillamine. *Salmonella* Ty_2 en produit de faibles quantités en milieu hypertonique. *Salmonella typhi murium* en produit davantage dans les mêmes conditions, de plus elle est capable d'en former dans des milieux de culture normotoniques. Donc, il semble que les mécanismes enzymatiques nécessaires à la production de pénicillamine semblent différents selon les souches car ils sont plus ou moins sensibles aux variations de tonicité.

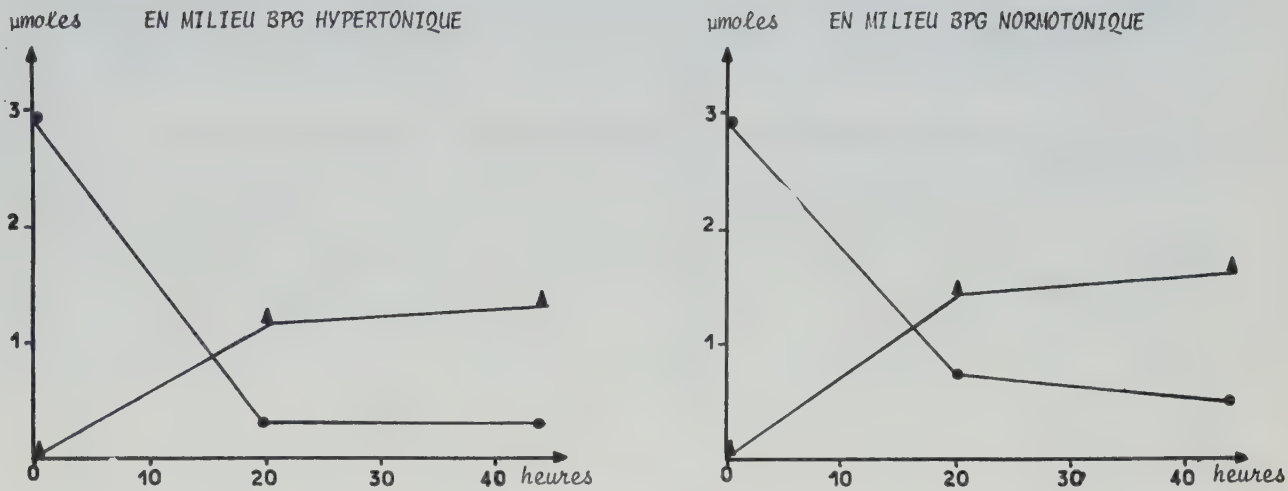
4- Citrobacter n° 30 et les colibacilles.

Ces souches ne produisent que de faibles quantités de pénicillamine en milieu hypertonique.

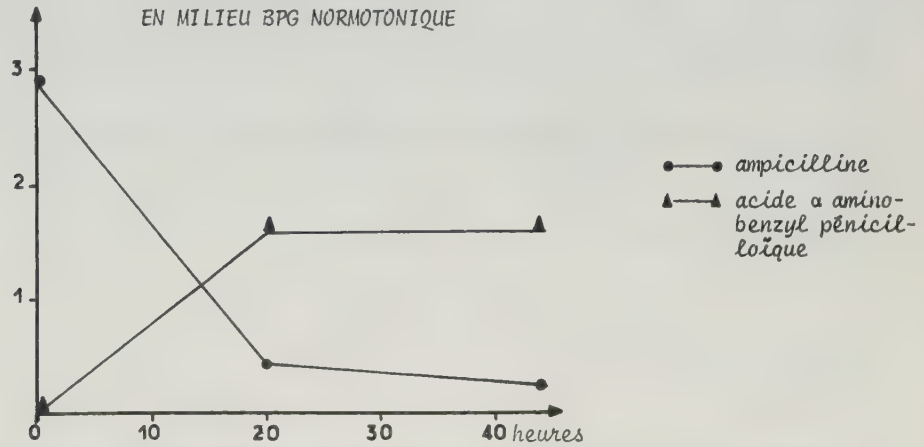
b) Production de pénicillamine à partir de la synthécilline.

La synthécilline est un substrat un peu moins favorable à cette production.

Deux résultats sont remarquables. *Klebsiella* n°5 en milieu isotonique, ne dégrade pas ce substrat en pénicillamine, alors que *Salmonella* Ty_2 en fait apparaître des traces dans les mêmes conditions de



a) KLEBSIELLA n° 5



b) KLEBSIELLA 418

DEGRADATION DE L'AMPICILLINE EN ACIDE PENICILLOIQUE CORRESPONDANT EN FONCTION DU TEMPS PAR DIVERSES SOUCHES

FIGURE 8

tonicité. Il semble que la production de pénicillamine en milieu normotonique ne corresponde pas à une très forte production en milieu hypertonique. On pourrait peut-être envisager une spécificité de substrat.

L'étude de ces deux substrats montre l'indépendance des deux mécanismes responsables de la formation de l'acide pénicilloïque et de la pénicillamine. En outre, un même germe ne métabolise pas de la même manière et dans les mêmes conditions toutes les pénicillines.

II. Dégradation de la méthicilline en pénicillamine.

Cette pénicilline est étudiée à part car sa dégradation en pénicillamine est assez originale. Elle est réputée insensible à la pénicillinase et instable à pH acide. En fait, les dosages iodométriques (figure 9) révèlent que la diméthoxy pénicilline est métabolisée par toutes les entérobactéries en acide pénicilloïque correspondant, les rendements étant variables avec les souches. Nous pourrions montrer que dans tous les cas les quantités de pénicillamine apparues n'ont aucun rapport avec la présence et la quantité d'acide pénicilloïque formé.

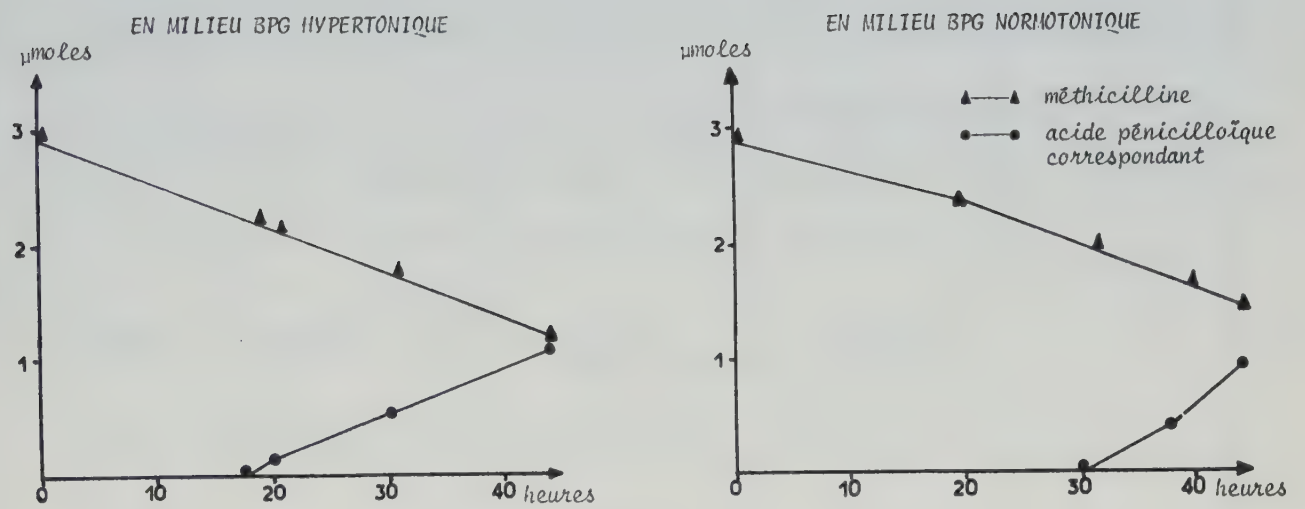
Les résultats sont présentés dans le tableau 15.

GERMES		*E. coli* O_{111} B_4	*E. Coli normaflore*	*Klebsiella n° 5*	*Citrobacter n°30*	*Klebsiella n418*	*Salmonella typhimurium*	*Salmonella* Ty_2
B. P. G. normotonique	24h	0	0	24	0	0	10	12
	48h	0	0	23	0	0	10	12
	72h	0	0	24	0	0	10	12
B. P. G. hypertonique	24h	20	18	26	30	12	32	26
	48h	20	18	30	31	18	31	26
	72h	15	15	29	29	20	26	25

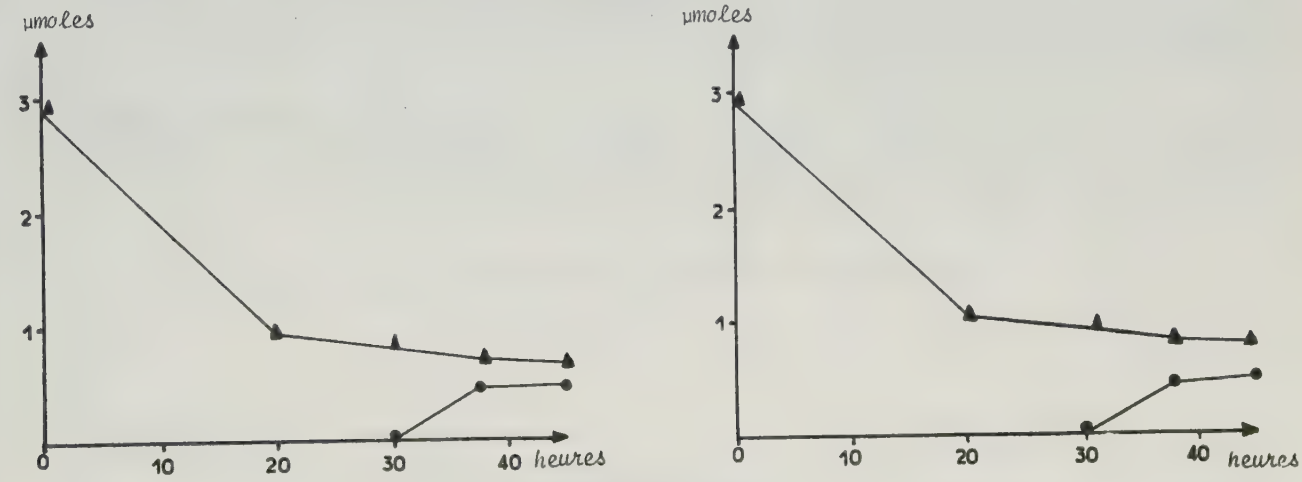
Tableau 15 - Production de pénicillamine par diverses souches à partir de la méthicilline en milieu B.P.G. normo et hypertonique.

Les résultats sont exprimés en µ g par ml de pénicillamine.

- *en milieu normotonique* 3 souches produisent de la pénicillamine :Klebsiella n°5 et les deux salmonelles.



a) KLEBSIELLA n° 5



b) SALMONELLA TY_2

DEGRADATION DE LA METHICILLINE EN ACIDE PENICILLOIQUE CORRESPONDANT
EN FONCTION DU TEMPS PAR DIVERSES SOUCHES

FIGURE 9

Les deux salmonelles font apparaître 10 à 12 µg par ml de pénicillamine, Klebsiella n°5, 23 à 24 µ g par ml. Dans ces trois hydrolysats, l'acide diméthoxy pénicilloïque n'est pas formé avant la 24ème heure.

- *En milieu hypertonique,* les salmonelles produisent des quantités de pénicillamine aussi importantes que *Citrobacter* n° 30 et *Klebsiella* n°5 soit 30 µg par ml. La production semble constante dans le temps et sujette à peu de variations pendant 72 heures de culture. *Klebsiella* 418 dégrade très mal la diméthoxy pénicilline en pénicillamine.

Ces résultats permettent d'affirmer que la production de pénicillamine est bien caractéristique de chaque souche et que chaque substrat est dégradé différemment par une souche donnée.

L'étude des trois substrats suivants renforce cette constatation.

III. Dégradation de l'oxacilline - la pénicilline V - l'hétacilline en pénicillamine.

Ces trois pénicillines sont résistantes aux pH acides. Ce sont les trois pénicillines les plus résistantes à la dégradation en pénicillamine comme le montre le tableau 16 . (voir page suivante).

L'oxacilline n'est jamais dégradée en milieu isotonique en pénicillamine. *Klebsiella* 418 ne peut pas produire de pénicillamine même en milieu hypertonique.

La pénicilline V est dégradée en pénicillamine par *Klebsiella* n°5 et *Citrobacter* faiblement en milieu isotonique, plus fortement en milieu hypertonique ; les autres souches donnent des valeurs très faibles sauf Salmonella Ty_2 qui donne des résultats nuls.

L'hétacilline est très peu dégradée en pénicillamine.

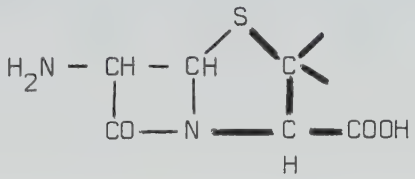
Toute cette étude sur l'apparition de pénicillamine lors de la dégradation bactérienne de la pénicilline portant sur un certain échantillonnage de germes et substrats, semble prouver que cette production est très fréquente en milieu hypertonique et franchement irrégulière en milieu normotonique. La présence de pénicillamine en milieu normotonique n'est pas forcément liée à une forte production en milieu hypersaccharosé : *Klebsiella* n°5 dégrade la diméthoxy pénicilline en pénicillamine avec la même intensité quelle que soit la tonicité du milieu ; certains germes comme les colibacilles sont incapables de faire apparaître des traces de pénicillamine dans un milieu non saccharosé : d'autres germes comme les Salmonelles donnent des résultats avec seulement tel ou tel substrat. Enfin les résultats très variables de *Klebsiella* 418 renforcent l'hypothèse d'une production spécifique d'une souche donnée.

GERMES		OXACILLINE		PENI.V.		HETACILLINE	
		B.P.G.	B.P.G. hyper-tonique	B.P.G.	B.P.G. hyper-tonique	B.P.G.	B.P.G. hyper-tonique
Klebsiella n°5	24 h	0	12,5	15	32	5	15
	48 h	0	15	15	39	5	13
	72 h	0	23	15	40	0	0
Klebsiella 418	24 h	0	0	0	18	0	0
	48 h	0	0	0	20	0	0
	72 h	0	0	0	21	0	0
Salmonella typhi murium n°103	24 h	0	12	0	10	0	0
	48 h	0	25	0	10	0	0
	72 h	0	25	0	10	0	0
Salmonella Ty_2	24 h	o	12	0	0	0	0
	48 h	0	25	0	0	0	0
	72 h	0	25	0	0	0	0
Citrobacter n°30	24 h	0	17	10	18	10	18
	48 h	0	17	10	20	10	18
	72 h	0	20	10	24	13	18
E. coli O_{111} B_4 n°3	24 h	0	10	0	10	0	5
	48 h	0	18	0	10	0	5
	72 h	0	22	0	0	0	0
E. coli normaflore n°20	24 h	0	0	0	12	0	5
	48 h	0	10	0	15	0	6
	72 h	0	10	0	10	0	10

Tableau 16 - Production de pénicillamine par diverses souches à partir de l'oxacilline, de la pénicilline V et de l'hétacilline, en milieu B.P.G. ou B.P.G. hypertonique.

Les résultats sont exprimés en µg par ml de pénicillamine

Pour tenter d'élucider le métabolisme enzymatique nécessaire à la production de pénicillamine, nous avons étudié son devenir en proposant comme seul substrat, le 6 APA : la molécule de pénicillamine est intacte dans le noyau des pénicillines.



IV. Dégradation du 6 APA en pénicillamine.

Le 6 APA est introduit sous forme d'acide 6-amino-pénicillanique dans les milieux normo ou hypertoniques ensemencés comme précédemment par les différents germes. L'inoculum et la concentration du 6 APA sont les mêmes que précédemment.

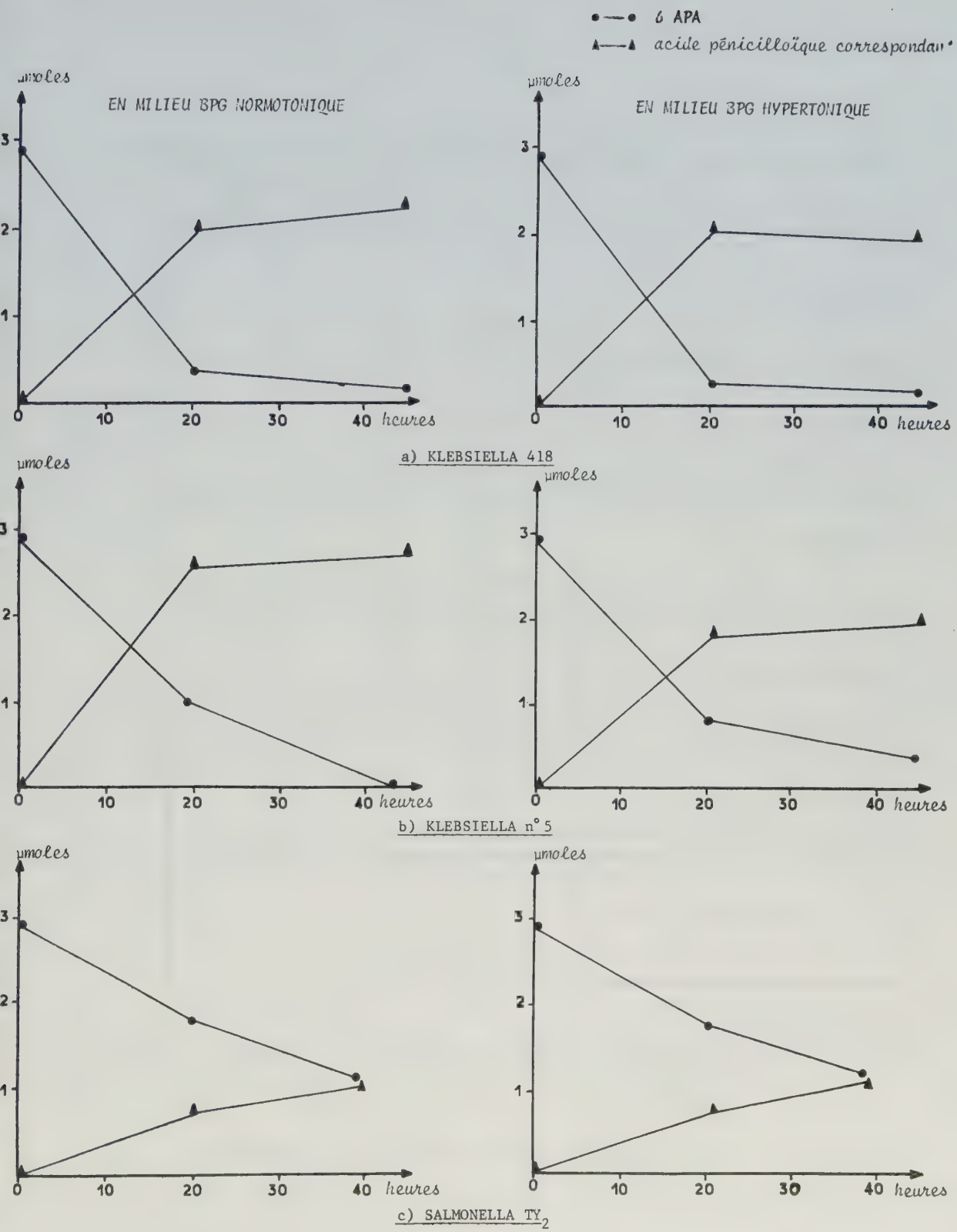
- *en milieu normotonique*, aucun germe n'est capable de produire de la pénicillamine. Ceci est vrai en milieux B.P.G. et Penassay.

- *en milieu hypertonique*, la pénicillamine n'est dosable que dans deux milieux de culture : ceux de *Klebsiella* n°5 et de *Klebsiella* 418, mais les quantités produites ne sont jamais supérieures à 12 µg par ml (tableau 17). (voir page suivante).

Il semble donc que le noyau 6 APA soit particulièrement résistant à ce mode d'hydrolyse bactérienne.

Ce substrat est considéré comme sensible aux β lactamases et sensible aux variations de pH. Est-ce que dans ces conditions l'acide 6-amino-pénicilloïque est hydrolysé en pénicillamine ?

1°/ Dosage iodométrique de l'acide 6-amino-pénicilloïque.
Comme les autres pénicillines, le 6 APA est dégradé en acide pénicilloïque par les β lactamases des entérobactéries. La figure 10 montre qu'en 40 heures, en milieu isotonique, 2,9 µ moles de 6 APA sont transformées par *Klebsiella* n°5 en 2,7 µ moles d'acide pénicilloïque. L'hydrolyse n'est pas aussi complète en milieu hypertonique. *Klebsiella* 418 produit des quantités comparables d'acide pénicilloïque en milieu isotonique et en milieu hypertonique. *Salmonella* Ty_2 dégrade en 20 heures plus du sixième du 6 APA présent, mais sans formation d'acide pénicilloïque correspondant.



a) KLEBSIELLA 418

b) KLEBSIELLA n° 5

c) SALMONELLA TY_2

DEGRADATION DU 6 APA EN ACIDE 6 AMINO PENICILLOIQUE CORRESPONDANT
EN FONCTION DU TEMPS PAR DIVERSES SOUCHES

F I G U R E 10

GERMES		6 APA	Acide 6-amino-pénicilloïque
Klebsiella n°5	24 h	20	20
	48 h	22	22
	72 h	18	20
Klebsiella 418	24 h	15	18
	48 h	21	22
	72 h	20	21
Salmonella Ty_2	24 h	0	15
	48 h	0	18
	72 h	0	14
Citrobacter n°3	24 h	0	13
	48 h	0	14
	72 h	0	12
E. coli O_{111} B_4 n°3	24 h	o	15
	48 h	0	15
	72 h	0	16
E. coli normaflore n°20	24 h	0	13
	48 h	0	14
	72 h	0	15

Tableau 17 - Production de pénicillamine par diverses souches à partir du 6 APA en milieu B.P.G. hypertonique.

Les résultats sont exprimés en µ g par ml de pénicillamine.

Donc, si le 6 APA est sensible aux β lactamases des entérobactéries, l'hydrolyse bactérienne ne semble pas pouvoir en l'absence de chaîne latérale couper le noyau thiazole pour former la pénicillamine. On pourrait ainsi supposer que la dégradation bactérienne de la pénicilline en pénicillamine emprunte une toute autre voie métabolique qui exclut le stade acide pénicilloïque. Tout au moins, comme les graphiques montrent qu'une très forte proportion d'acide 6 APA dégradé est transformée en acide pénicilloïque, il semble que l'acide 6-amino-pénicilloïque n'est pas un bon substrat pour la production de pénicillamine.

2°/ Mesure des pH des milieux après 24 heures de culture.

L'absence de pénicillamine dans les hydrolysats bactériens de 6 APA permet d'affirmer que la production de pénicillamine n'est pas une dégradation spontanée obtenue dans les milieux de culture par abaissement du pH. En effet, dans les milieux B.P.G. hypertoniques d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 et de *Klebsiella* n°5, les pH suivants ont été mesurés après 24 heures de culture.

Le pH du bouillon non ensemencé ..... = 6,2
Le pH de la culture d' *E. coli* O_{111} B_4... = *4,7*
Le pH de la culture de *Klebsiella* n°5..... = *4,6*

Les pH sont identiques à ceux mesurés dans les milieux contenant la benzylpénicilline comme substrat, et où *Escherichia coli* et *Klebsiella* n°5 avaient fait apparaître de la pénicillamine. Donc, l'abaissement du pH n'est certainement pas un facteur provoquant la formation de pénicillamine, le 6 APA étant aussi sensible à l'hydrolyse acide que la benzylpénicilline.

Il semble que la présence d'une chaîne latérale, amidant la fonction $-NH_2$ du 6 APA, soit indispendable à la formation de la pénicillamine quelle que soit la voie métabolique utilisée.

B. LES ACIDES PENICILLOIQUES.

Pour préciser le rôle exact de l'acide pénicilloïque dans la production de pénicillamine, nous l'avons proposé comme substrat unique à la dégradation bactérienne, dans les conditions identiques de culture. Notre étude porte essentiellement sur l'acide benzylpénicilloïque et sur l'acide 6-amino-pénicilloïque.

I. Dégradation de l'acide benzylpénicilloïque en pénicillamine.

Il a été obtenu par traitement de 2.000 unités par ml de Pénicilline G par 10.000 unités par ml de bactopénase Difco, pendant 2 heures à la température du laboratoire. Le nouveau substrat est mis en présence de tous les germes utilisés précédemment. Des milieux témoins contenant de la benzylpénicilline ont été ensemencés parallèlement et dans les mêmes conditions.

Le tableau 18 indique les différentes quantités de pénicillamine dosées dans les milieux, centrifugés au préalable. (voir tableau page suivante).

Il est évident que l'acide benzylpénicilloïque n'est pas davantage hydrolysé spontanément en pénicillamine que la pénicilline elle-même.

- *En milieu normotonique*, des germes comme les colibacilles et les salmonelles qui ne dégradent pas la benzylpénicilline en pénicillamine, sont tous capables de dégrader l'acide pénicilloïque en pénicillamine. Seule *Klebsiella* 418 ne dégrade aucun des deux substrats.

- *En milieu hypertonique*, tous les germes produisent de la pénicillamine. En général, les quantités produites à partir de l'acide pénicilloïque sont supérieures à celles produites à partir de la pénicilline intacte. Seules les Klebsielles dégradent également les deux substrats. Les β lactamases de ces souches dégradent la pénicilline en acide pénicilloïque dans les trois premières heures de culture, ce qui fait que de toutes façons, ces souches ont à leur disposition les deux substrats.

Les résultats sont très étonnants puisque nous avions montré qu'apparemment il n'y avait aucun rapport entre l'apparition de l'acide pénicilloïque et de la pénicillamine dans les milieux de culture, et entre la quantité d'acide présent et la quantité de pénicillamine formée. Les résultats obtenus dans les différents milieux de culture de Klebsielles permettent d'admettre que la quantité de pénicillamine dosée peut être la résultante de l'hydrolyse de la pénicilline et de l'acide pénicilloïque. D'autre part, seules les souches ayant une forte activité β lactamasique sont capables de dégrader la pénicilline et l'acide pénicilloïque en pénicillamine, avec le même rendement. Peut-être pouvons-nous conclure que l'acide pénicilloïque n'est dégradé en pénicillamine que dans les premières heures de culture.

II. *Dégradation de l'acide 6-amino-pénicilloïque en pénicillamine.*

En traitant de la même façon 2,9 µ moles par ml d'acide 6-amino-pénicillénique par 10.000 unités par ml de bactopénase, nous obtenons 2,9 µ moles par ml d'acide 6-amino-pénicilloïque.

Ce substrat mis en présence de 600 M̄ de germes en milieu B.P.G. normotonique ou hypertonique donne les résultats suivants : (tableau 17). En milieu normotonique aucun germe ne produit de pénicillamine. En milieu hypertonique, les germes en produisent 12 à 15 µ g par ml, sauf *Klebsiella* n°5 qui en produit 22 µ g par ml.

Le 6 APA et l'acide pénicilloïque correspondant sont donc de très mauvais substrats. Comme la présence d'une amidase bactérienne fait apparaître cette molécule dans les milieux de culture, nous pouvons penser que cette enzyme n'a aucune influence favorable sur la production de pénicillamine.

Milieu B.P.G.		Milieu isotoniq.		Milieu hyperton.	
Substrat		Pénicilline G	Acide benzylpénicilloïque	Pénicilline G.	Acide benzylpénicilloïque
E. coli O_{111} B_4 n°3	24 h	0	20	25	40
	48 h	0	18	30	42
	72 h	0	15	30	39
E.coli normaflore N°20	24 h	0	19	30	49
	48 h	0	18	30	50
	72 h	0	18	28	50
Klebsiella n°5	24 h	15	14	35	34
	48 h	17	17	54	50
	72 h	16	15	46	45
Klebsiella 418	24 h	0	0	42	47
	48 h	0	0	49	54
	72 h	0	0	50	51
Citrobacter n°30	24 h	15	15	21	35
	48 h	12	12	28	38
	72 h	12	12	32	38
Salmonella Ty_2	24 h	0	15	25	38
	48 h	0	18	28	42
	72 h	0	16	27	45
Salmonella typhi murium n°101	24 h	0	22	18	30
	48 h	0	16	22	38
	72 h	0	18	20	38

Tableau 18 - Production de pénicillamine par diverses souches microbiennes au cours de l'hydrolyse de la benzylpénicilline et de l'acide pénicilloïque correspondant.

Les résultats sont exprimés en µ g/ml de pénicillamine.

Il semble évident que la chaîne latérale des pénicillines doit jouer un rôle primordial dans la production de pénicillamine.

CONCLUSION.

Toutes les pénicillines peuvent être plus ou moins dégradées par les germes en pénicillamine, mais il est difficile de systématiser les résultats.

1. Influence du substrat.

On ne peut pas conclure que les pénicillines stables à pH acide résistent mieux à cette dégradation que les autres pénicillines, puisque l'ampicilline donne les mêmes rendements en pénicillamine que la Pénicilline G. De même les pénicillines sensibles aux β lactamases ne sont pas meilleures productrices de pénicillamine que les autres, puisque la diméthoxy pénicilline est dégradée dans les mêmes proportions que la benzylpénicilline ou l'ampicilline. La présence de la chaîne latérale semble primordiale puisque seul le 6 APA n'est pour ainsi dire pas métabolisé en pénicillamine par les germes. L'acide benzylpénicilloïque lui, semble être un bon substrat dégradé dans les toutes premières heures de culture. Ceci semblerait assez incompatible avec la production tardive de la pénicillamine, pourtant de nombreux résultats nous forcent à l'admettre. Il faut en outre, remarquer que l'acide benzylpénicilloïque n'est pas hydrolysé en pénicillamine dans les mêmes conditions de tonicité que la benzylpénicilline. Les colibacilles et les salmonelles en milieu normotonique ne métabolisent que l'acide benzylpénicilloïque. Faut-il admettre deux mécanismes d'hydrolyse en pénicillamine différents, l'un acceptant la benzylpénicilline, l'autre l'acide benzylpénicilloïque ? La quantité de pénicillamine dosée serait la somme de ces deux métabolismes.

2. Influence des germes.

On ne peut pas conclure qu'un germe déterminé soit toujours le meilleur producteur de pénicillamine quel que soit le substrat proposé. En effet, *Klebsiella* n°5 dégrade très fortement la benzylpénicilline et l'ampicilline en pénicillamine, mais d'autres germes en produisent des quantités supérieures à partir de la synthécilline, l'oxacilline et l'hétacilline. *Klebsiella* 418 est l'entérobactérie qui dégrade avec le plus d'intensité la benzylpénicilline et l'ampicilline, mais ne dégrade pas l'oxacilline et l'hétacilline. Il semble que la production de pénicillamine est réellement une caractéristique de la souche microbienne.

3. Influence des conditions de culture.

On ne peut pas conclure que la production de pénicillamine en milieu isotonique corresponde forcément à une très forte production en

milieu hypertonique. *Klebsiella* 418 ne produit jamais de pénicillamine en milieu isotonique. Certaines souches comme les salmonelles en produisent de faibles quantités selon les substrats proposés.

Ainsi, quels que soient la pénicilline utilisée et l'équipement enzymatique de la souche, les résultats ne sont pas identiques et varient même pour une même souche en fonction de la tonicité du milieu. Ceci évoque l'existence de substrat préférentiel et d'activité propre à une souche. La production de pénicillamine serait-elle sous dépendance enzymatique ?

---°---

Chapitre IV

LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE EST-ELLE DUE A UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE ?

Les résultats précédents montrent que la formation de pénicillamine ne semble dépendre ni d'une acylase, ni d'une β lactamase. Deux hypothèses peuvent être envisagées.

1) La pénicillamine est le produit d'une hydrolyse spontanée de la pénicilline.

2) La formation de la pénicillamine est le résultat d'une dégradation enzymatique des pénicillines ou de certains de leurs métabolites.

La première hypothèse est peu vraisemblable car il n'y a pas de pénicillamine formée dans les tubes témoins non ensemencés. Pour essayer de vérifier la deuxième hypothèse, nous avons recherché.

1°) si l'induction préalable de l'inoculum augmentait le rendement en pénicillamine,

2°) si l'on pouvait déterminer un pH et une température optimum.

3°) si la production de pénicillamine était modifiée par des inhibiteurs de la synthèse protéique.

MATERIEL ET METHODES.

A. CONDITIONS D'INDUCTION DES SOUCHES.

Toutes les souches étudiées dans le chapitre II ont été induites selon la méthode de NOVICK (165). L'induction est faite dans le milieu de culture contenant 1 µ g par ml ou 2 unités de pénicilline.

L'inoculum âgé de 18 heures est de 0,02 à 0,04 mg de poids sec de bactéries par ml. NOVICK, induisant des β lactamases, utilisait comme agent inducteur la diméthoxy pénicilline. Dans cette étude la Pénicilline G a été utilisée pour que l'inducteur soit la même pénicilline que le substrat. Après 4 heures de culture sous agitation à 37°C, 600 M de germes induits sont introduits dans les milieux B.P.G. contenant 2.000 unités par ml de benzylpénicilline, soit 2,9 µmoles. Des témoins avec des inoculums non induits sont faits parallèlement. Les diverses quantités de pénicillamine produites sont comparées.

B. OBTENTION DES GERMES AU REPOS.

Pour déterminer l'optimum thermique de la production de pénicillamine, des suspensions de germes en tampon phosphate ont été utilisées. Des cultures de 18 heures en milieu B.P.G. sont centrifugées 30 minutes à 8.000 tours/minute. Les culots des germes sont lavés deux fois à l'eau distillée stérile puis la densité bactérienne est ajustée au spectrophotomètre (λ = 670 m µ) de façon à obtenir 5 mg de poids sec de bactéries par ml, en tampon phosphate 0,01 M de pH = 6,8 contenant 5.000 unités par ml de pénicilline.

Trois échantillons seront préparés par germe. Les deux premiers seront réalisés avec des germes induits soit par 2 µ g par ml de benzylpénicilline, soit par 2 µ g par ml d'acide benzylpénicilloïque, selon la méthode de Novick . Le troisième échantillon réalisé avec des germes non induits servira de témoin.

C. DETERMINATION DE LA RESISTANCE DES SOUCHES DE KLEBSIELLA AU CHLORAMPHENICOL.

L'expérience pour étudier l'action d'un inhibiteur de la synthèse protéique sur la production de pénicillamine a été faite en milieu de Monod glucosé et saccharosé à 20 pour cent. Deux souches seulement ont été utilisées, les autres étant sensibles à l'action du chloramphénicol ; ce sont *Klebsiellae* n° 5 et 418. Dans ces conditions de culture, les C.M.I. du chloramphénicol pour ces souches sont de 2.000 µg par ml, et celles de la benzylpénicilline de 2.000 unités par ml.

Si ces milieux contiennent 600 M de germes par ml et 2.000 unités par ml de benzylpénicilline, l'addition de 200 µ g par ml de chloramphénicol ne modifie pas le pourcentage de survivants. Aussi, l'expérience a consisté à introduire dans 14 tubes de milieu de Monod saccharosé, 2.000 unités par ml de Pénicilline G et 5 mg de poids sec de bactéries par ml. Dans chaque tube, des concentrations différentes de chloramphénicol ont été ajoutées de façon à obtenir une gamme comprise entre 200 et 0,025 µ g par ml. Une série de tubes sans chloramphénicol a servi de témoin. La pénicillamine a été recherchée et dosée dans chaque tube.

II. RESULTATS.

A. PRODUCTION DE PENICILLAMINE APRES INDUCTION PREALABLE DES GERMES.

1. Induction par la benzylpénicilline.

Avec des souches induites selon la technique de Novick par 1 µ g par ml de benzylpénicilline, nous avons obtenu les résultats suivants :

1. *Induction des souches dépourvues de β lactamase.*

Ces souches sont *Salmonella* Ty_2 et *Salmonella typhi murium* n°101. Elles sont assez peu sensibles à l'induction par deux unités par ml de benzylpénicilline ; le rendement en pénicillamine augmente cependant de 30 à 40 pour cent.

2. *Induction des souches possédant des β lactamases constitutives.*

HAMILTON MILLER (96) (98) (220) a montré que toutes les entérobactéries qui sont pourvues de β lactamase, possèdent une enzyme constitutive car insensible à l'induction par de faibles quantités de pénicilline. Les dosages iodométriques (figure 11) ont montré qu'en effet toutes les entérobactéries étudiées possèdent des β lactamases qui ne sont pas inductibles par un µ g par ml de benzylpénicilline. Les très faibles augmentations d'activité observées seraient dues aux modifications de la perméabilité de la paroi (221): elles ne sont jamais supérieures à 1 pour cent.

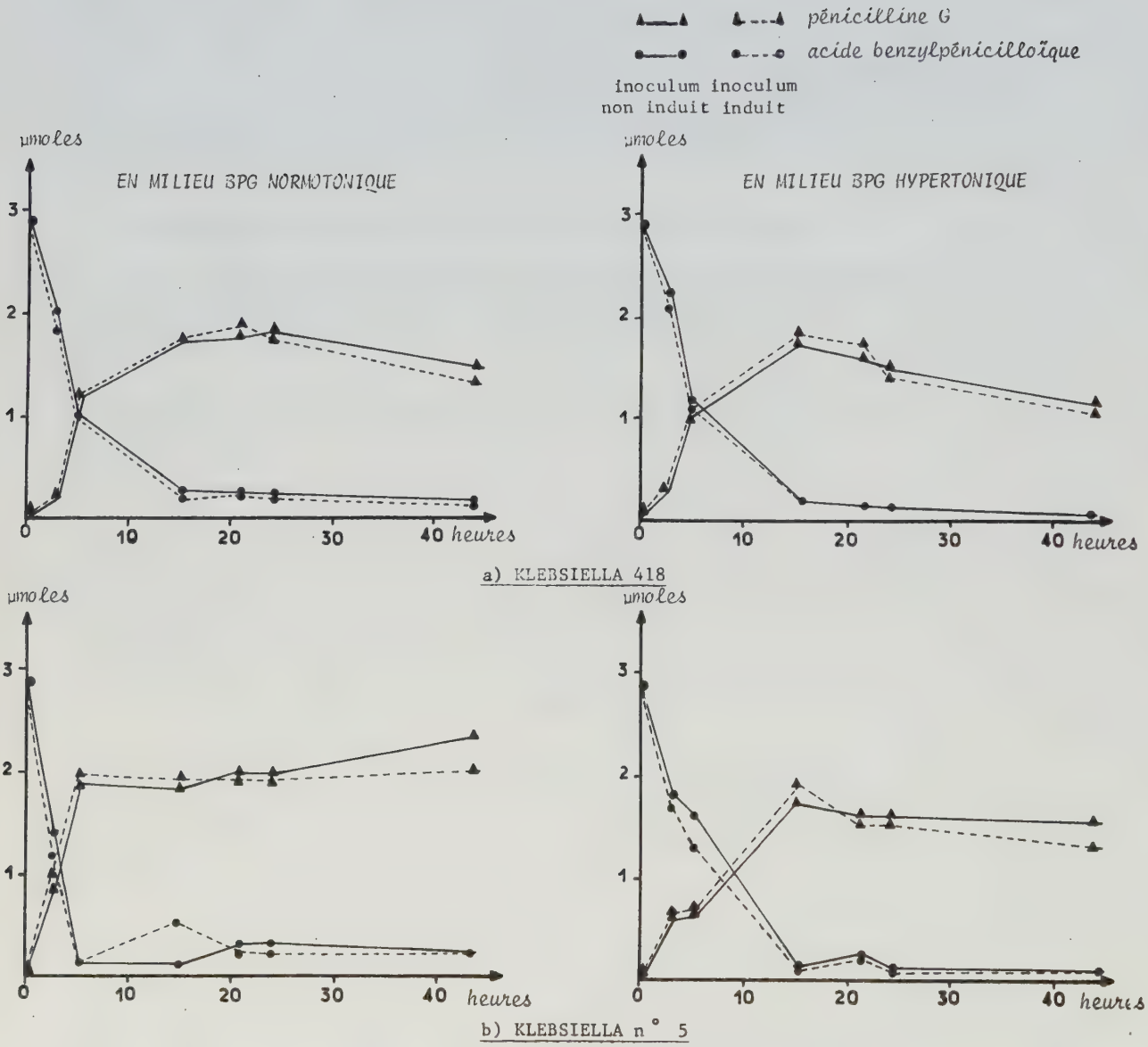
Les pseudomones 100 et "Loumaigne" ne possèdent pas non plus de β lactamase inductible.

a) Etude des entérobactéries.

- *Les Escherichia coli.*

600 $\bar{M}$ d'*Escherichia coli normaflore* préalablement induits ou non induits sont mis en présence de 2.000 unités par ml de benzylpénicilline dans un milieu B.P.G. saccharosé. Le tableau 19 indique les quantités de pénicillamine présentes dans les milieux après centrifugation des germes après 24, 48 et 72 heures de culture.(voir tableau 19 page suivante).

Il apparaît qu'en pourcentage, l'induction de l'inoculum par de faibles quantités de pénicilline augmente de 56 à 60 pour cent la production de pénicillamine dans les milieux ensemencés par le colibacille.



DEGRADATION DE LA BENZYL PENICILLINE EN ACIDE PENICILLOIQUE
EN FONCTION DU TEMPS ET DE L'INOCULUM INDUIT OU NON INDUIT

FIGURE 11

GERMES 37°		MILIEU B.P.G. HYPERTONIQUE	
		Inoculum normal	Inoculum induit
E.coli normaflore n°20	24 h	15	35
	48 h	17	36
	72 h	17	35

Tableau 19 - Production de pénicillamine à partir de 2.000 unités par ml de benzylpénicilline par 600 M d'Escherichia coli normaflore induits ou non induits par 2 unités par ml de pénicilline.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml.

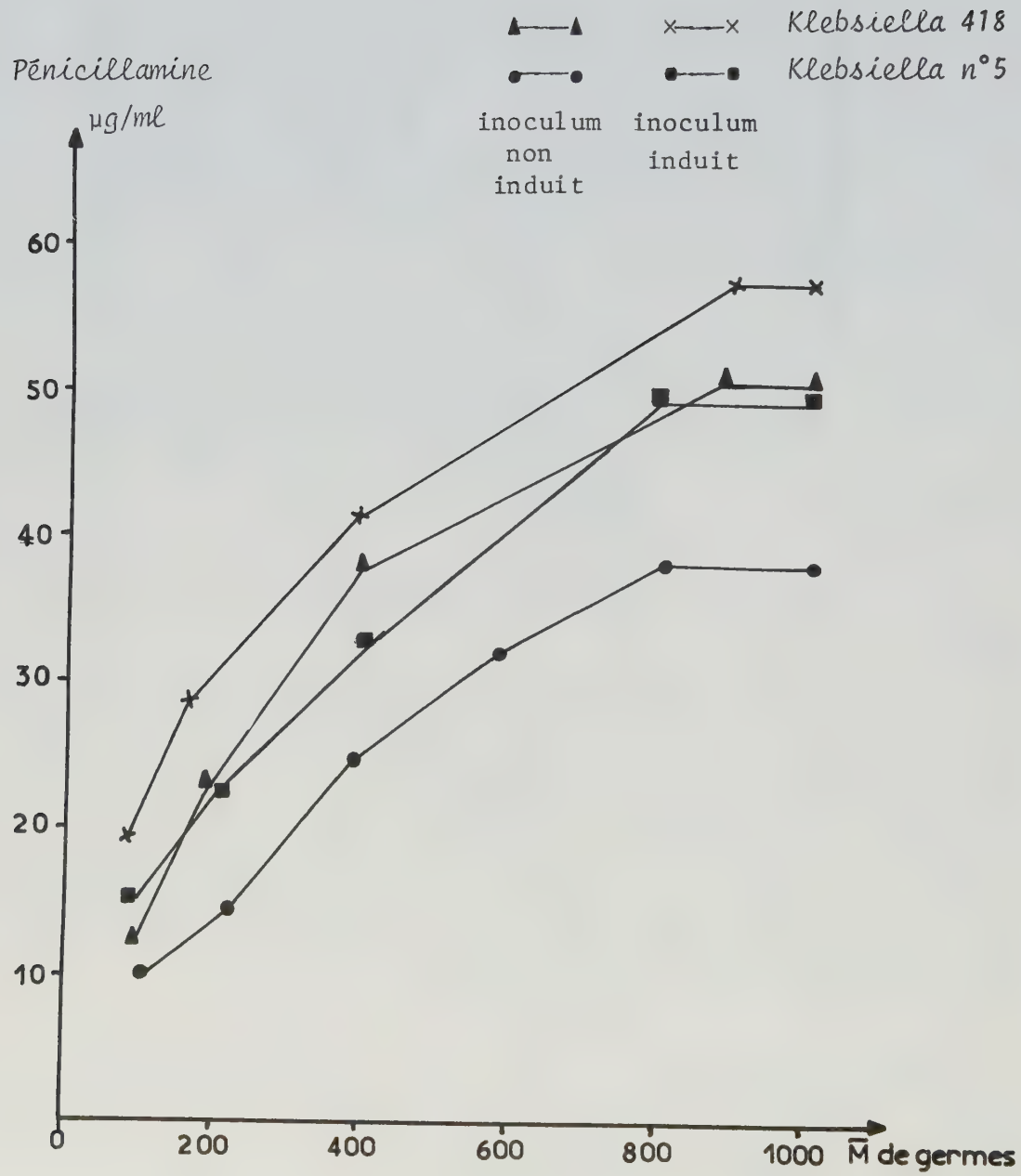
Mais les pourcentages ne sont pas semblables pour tous les colibacilles testés, ce qui indique que la production de pénicillamine est bien une caractéristique d'une souche et non pas d'une espèce. L'induction augmente le rendement d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 de près de 80 pour cent alors que celui d'*Escherichia coli* K_{12} C_{600} n'est pas modifié. En effet, les quantités de pénicillamine dosées dans les milieux B.P.G. saccharosés d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 , après 48 heures de culture sont de 12 µ g par ml, si l'inoculum n'est pas préalablement induit, et de 50 µg par ml si l'inoculum est induit. La production de pénicillamine peut donc être selon la souche soit constitutive, soit inductible. Elle n'est pas caractéristique d'une espèce bactérienne.

- *Les Klebsielles.*

La sensibilité des Klebsielles à l'induction a été étudiée en fonction du nombre de germes. Deux galeries de tubes de milieu B.P.G. hypertonique contenant 2.000 unités par ml de benzylpénicilline sont ensemencées avec un inoculum de *Klebsiella* n°5 ou de *Klebsiella* 418 induits au préalable de façon à réaliser des concentrations bactériennes allant de 100 à 1.000 M de germes par ml.

Parallèlement, deux galeries identiques ont été ensemencées de la même manière avec des inoculums non induits.

Les productions de pénicillamine sont figurées sur la figure 12.



INFLUENCE DE L'INDUCTION DE L'INOCULUM
SUR LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE
1.000 µg/ml de Pénicilline G
milieu BPG hypertonique

F I G U R E 12

Klebsiella 418 est très peu sensible à l'induction par 2 µg par ml de pénicilline, les quantités augmentant de 16 à 20 pour cent. Dans les milieux ensemencés par *Klebsiella* n°5, la production de pénicillamine augmente en fonction du nombre de germes. En présence de 200 M de germes par ml l'augmentation est de 6 µg par ml et de 15 µg par ml en présence de 800 M de germes par ml. En pourcentage, l'augmentation est de 30 pour cent.

De cette étude, il ressort que :

1° - l'induction des souches augmente la production de pénicillamine proportionnellement au nombre de germes présents.

2° - les entérobactéries ont leur production de pénicillamine qui augmente de 30 à 85 pour cent après induction par 1 µ g par ml de benzylpénicilline. Leur β lactamase étant constitutive, ce n'est pas une plus forte activité pénicillinasique qui favorise l'augmentation des quantités de pénicillamine produites. Il y a donc dissociation entre les deux productions.

b) Etude des Pseudomonas.

Le *Pseudomonas* "Loumaigne" qui possède une β lactamase constitutive très active, que la souche soit induite ou non induite, produit toujours les mêmes quantités de pénicillamine. Donc, chez ce germe, les productions d'acide pénicilloïque et de pénicillamine sont insensibles à l'induction par 2 unités par ml de Pénicilline G.

Si nous rappelons que la souche *Pseudomonas* 100, qui possède une β lactamase constitutive de même activité que celle de Pseudomonas "Loumaigne" ne produit jamais, quelles que soient les conditions de culture, de pénicillamine, il apparaît que les productions d'acide pénicilloïque et de pénicillamine sont entièrement indépendantes l'une de l'autre. Elles peuvent se manifester l'une sans l'autre, et quand la pénicillinase est constitutive, le système responsable de la formation de pénicillamine est soit constitutif, soit inductible. L'étude de la souche de staphylocoque doré 1 B qui possède une β lactamase inductible va compléter cette approche.

3. Induction d'une souche avant une β lactamase inductible.

L'induction par deux unités par ml de benzylpénicilline de *Staphylococcus aureus* I B multiplie par 4 la production d'acide pénicilloïque. Or, la formation de pénicillamine dans les milieux ensemencés avec les germes induits et non induits est comparable. Après 24 heures d'incubation, dans les conditions de culture habituelles, les quantités de pénicillamine produites par les germes induits sont de 60 µ g par ml, par les germes non induits de 55 µ g par ml. Après 48 heures de culture, elles sont respectivemnnt de 85 et 72 µg par ml. Une souche peut donc avoir une pénicillinase inductible et une production de pénicillamine non inductible.

Ainsi, nous pouvons affirmer que l'apparition d'acide pénicilloïque et de pénicillamine est sous la dépendance de deux systèmes entièrement différents l'un de l'autre. Nous venons en effet de montrer que :

1) les salmonelles qui ne possèdent pas de pénicillinase ont une production de pénicillamine sensible à l'induction.

2) *Escherichia coli* K_{12} possède une pénicillinase constitutive et a une production de pénicillamine non inductible.

3) Les *Escherichia coli* O_{111} B_4 et *normaflore* et les Klebsielles ont une pénicillinase constitutive et leur production de pénicillamine est inductible.

4) *Pseudomonas* 100 a une pénicillinase constitutive et ne peut pas produire de pénicillamine.

5) *Staphylococcus aureus* I B a une pénicillinase inductible et une production de pénicillamine constitutive.

Tout ceci peut être confirmé par le fait que la pénicilline n'est pas le seul agent inducteur capable d'augmenter les quantités de pénicillamine produites.

II. Induction par l'acide benzylpénicilloïque.

Toutes les souches d'entérobactéries préalablement étudiées ont été induites parallèlement par 1 µg par ml de benzylpénicilline et 1 µ g par ml d'acide benzylpénicilloïque.

a- Les deux inoculums ont été ensemencés chacun en milieu B.P.G. hypertonique contenant 2.000 unités par ml de benzylpénicilline, selon les conditions habituelles de culture.

Les résultats sont présentés dans le tableau 20 et les dosages de PAL ont été faits sur les milieux préalablement centrifugés. (voir tableau 20 page suivante).

Il apparaît que, quel que soit l'agent inducteur, la pénicilline est dégradée avec la même intensité en pénicillamine. Et cela est vrai pour tous les germes testés. Après 24 heures de culture dans les bouillons d'*Escherichia coli* O_{111} B_4, on en dose 30 et 32 µg par ml, dans ceux de *Citrobacter* n°30, 25 et 26 µ g par ml, dans ceux de *Klebsiella* n°5, 43 et 45 µg par ml.

b- Si les milieux B.P.G. contiennent 1.000 µg par ml d'acide pénicilloïque, le tableau 20 montre que quel que soit l'agent inducteur, les quantités de pénicillamine produites sont égales. *Escherichia coli* O_{111} B_4 en produit 35 µ g par ml, *Citrobacter* 40 et 35 µg par ml, *Klebsiella* 43 µ g par ml. Nous observons à nouveau que tous les germes, sauf *Klebsiella* n°5, produisent davantage de pénicillamine à partir de l'acide pénicilloïque que de la Pénicilline G.

SUBSTRAT		PENICILLINE G		ACIDE BENZYL PENICILLOIQUE		6 AMINO PENICILLAMIQUE		Ac.6 AMINO PENICILLOIQUE	
INDUCTEUR		Pénicilline G.	Ac.benzyl-pénicilloique	Pénicilline G.	Ac.benzyl-pénicilloique	6 APA	Ac.6 amino pénicilloique	6 APA	Ac.6 amino pénicilloique
E.coli $O_{111}B_4$	24 h	30	32	35	35	0	0	15	13
	48 h	35	35	39	40	0	0	15	16
	72 h	35	34,5	39	40	0	0	16	16
E.coli norma-flore n°20	24 h	28	32	42	38	o	0	13	11
	48 h	28	30	40	40	0	0	14	15
	72 h	28	28	40	40	0	0	15	18
Citrobacter n°30	24 h	25	26	40	35	0	0	13	10
	48 h	27	28	35	38	0	0	14	15
	72 h	27	27	39	38	0	0	12	20
Klebsiella n°5	24 h	43	45	43	43	20	21	20	15
	48 h	45	46	45	45	22	22	22	22
	72 H	46	46	46	45	18	22	20	22
Salmonella Ty_2	24 h	25	27	36	38	0	0	15	15
	48 h	28	33	39	40	0	0	18	15
	72 h	27	32	40	40	0	0	14	12

Tableau 20 - Production de pénicillamine par diverses souches induites ou non par 1 µg/ml de pénicilline ou d'acide pénicilloïque correspondant à partir de différents substrats.

La culture est faite en milieu B.P.G. saccharosé à 20 pour cent. Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg/ml.

En conclusion, il apparaît nettement que la production de pénicillamine à partir de la benzylpénicilline soit sensible à l'induction non seulement par la pénicilline elle-même, mais aussi par l'acide pénicilloïque. Comme les β lactamases des entérobactéries ne sont en aucun cas sensibles à l'induction par l'acide pénicilloïque, nous pensons avoir démontré que la formation de pénicillamine est totalement indépendante de la présence de cette enzyme.

III. Induction par le 6 APA et l'acide 6-amino-pénicilloïque.

Dans les mêmes conditions que précédemment, l'induction est faite soit par 1 µg par ml de 6 APA, soit par 1 µg par ml d'acide 6 amino-pénicilloïque. Les deux inoculums induits obtenus ont été ensuite ensemencés.

1° - Dans des milieux contenant 2,9 µmoles de 6 APA.
2°.- Dans des milieux contenant 2,9 µmoles d'acide pénicilloïque.

La pénicillamine a été recherchée après 24, 48 et 72 heures de culture à 37°C. dans les différents milieux.

Les résultats inscrits dans le tableau 20 et ceux inscrits dans le tableau 17, sont comparables. Donc, le 6 APA n'est que très peu dégradé en pénicillamine et l'induction n'augmente nullement les quantités de pénicillamine produites.

La chaîne latérale pourrait jouer un rôle dans la dégradation de la pénicilline en pénicillamine..

Ces trois séries d'expériences permettent donc de conclure que :

1°. la production de pénicillamine est un processus pouvant être inductible et totalement indépendant de l'activité de la β lactamase.

2°. les quantités de pénicillamine produites sont toujours plus importantes par dégradation de l'acide pénicilloïque, que par dégradation de la pénicilline elle-même.

3°. la recherche de la dégradation du 6 APA en pénicillamine est particulièrement intéressante. Il apparaît que le 6 APA et l'acide pénicilloïque correspondant sont très peu métabolisés en pénicillamine et la production de pénicillamine à partir de ces substrats n'est sensible à l'induction ni par le 6 APA, ni par l'acide pénicilloïque correspondant.

B. LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE A-T-ELLE des OPTIMUMS D'ACTIVITES?

La production de pénicillamine est un processus inductible, elle doit donc dépendre d'un processus enzymatique. Nous avons essayé de préciser quelles étaient les conditions optima nécessaires à la formation de pénicillamine.

Les trois paramètres qui ont été étudiés sont :

- influence du pH,
- influence de la température,
- influence d'inhibiteurs de la synthèse protéique sur la production de pénicillamine.

1. Influence du pH.

Utilisant *Escherichia coli* O_{111} B_4 n°3, il a été déjà montré que des variations de pH modifiaient la production de pénicillamine, les quantités maxima étant obtenues pour un pH compris entre 6,8 et 7,2.

2. Influence de la température.

La variation de la production de pénicillamine en fonction de la température a été étudiée en utilisant deux souches : *Klebsiella* n°5 et *Klebsiella* 418 sous forme de germes au repos. Ainsi, en tampon phosphate, 5 mg de poids sec de bactéries par ml peuvent produire de faibles quantités de pénicillamine à partir de 5.000 unités par ml de Pénicilline G.

Ce mode de culture permettra de faire plusieurs constatations.

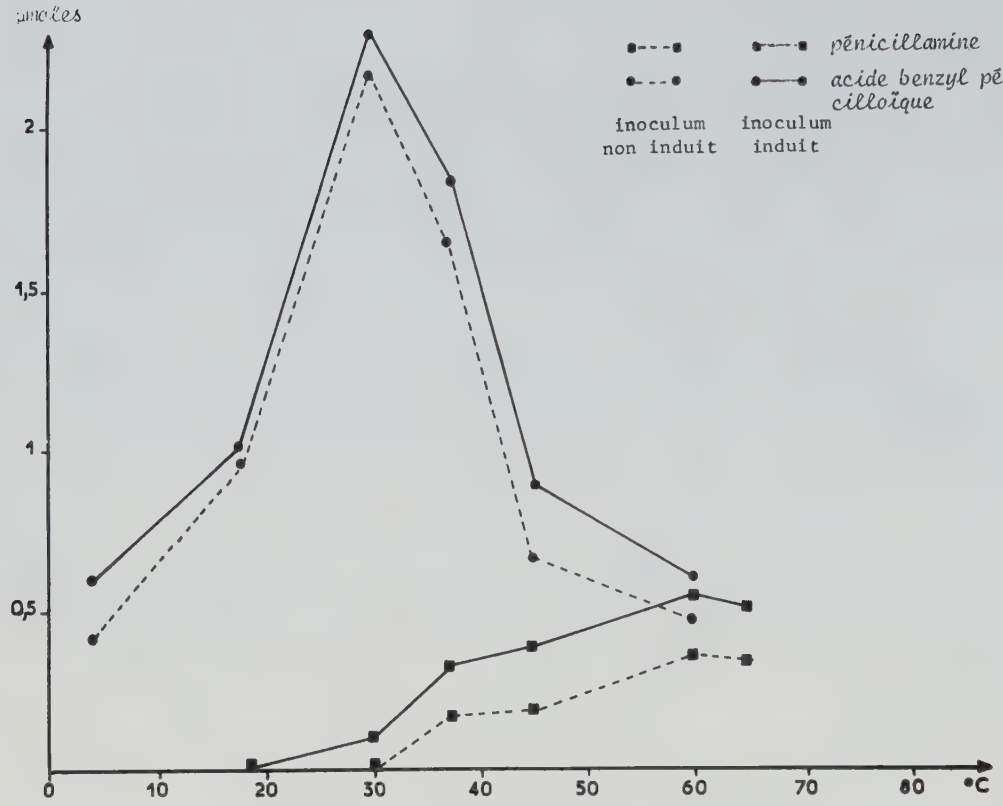
a) Klebsiella n°5.

Une série de tubes est ensemencée avec des germes préalablement induits par deux unités par ml de benzylpénicilline, une autre avec des germes non induits. Chaque échantillon est placé 72 heures à des température différentes : + 4°C, + 18°C, + 30°C, + 37°C, + 45°C, + 60°C. Des suspensions bactériennes ont été immergées 1,2,3, 5,7 minutes en bain-marie bouillant. Les quantités de Pénicilline G ne sont ajoutées qu'après refroidissement des tubes, qui sont alors placés à l'étuve à 37°C.

Au bout de 24 heures, les bactéries sont éliminées par centrifugation 30 minutes à 9.000 tours/minute. Dans le surnageant, la quantité d'acide pénicilloïque formée a été dosée par la méthode iodométrique, la quantité de pénicillamine par la méthode de PAL.

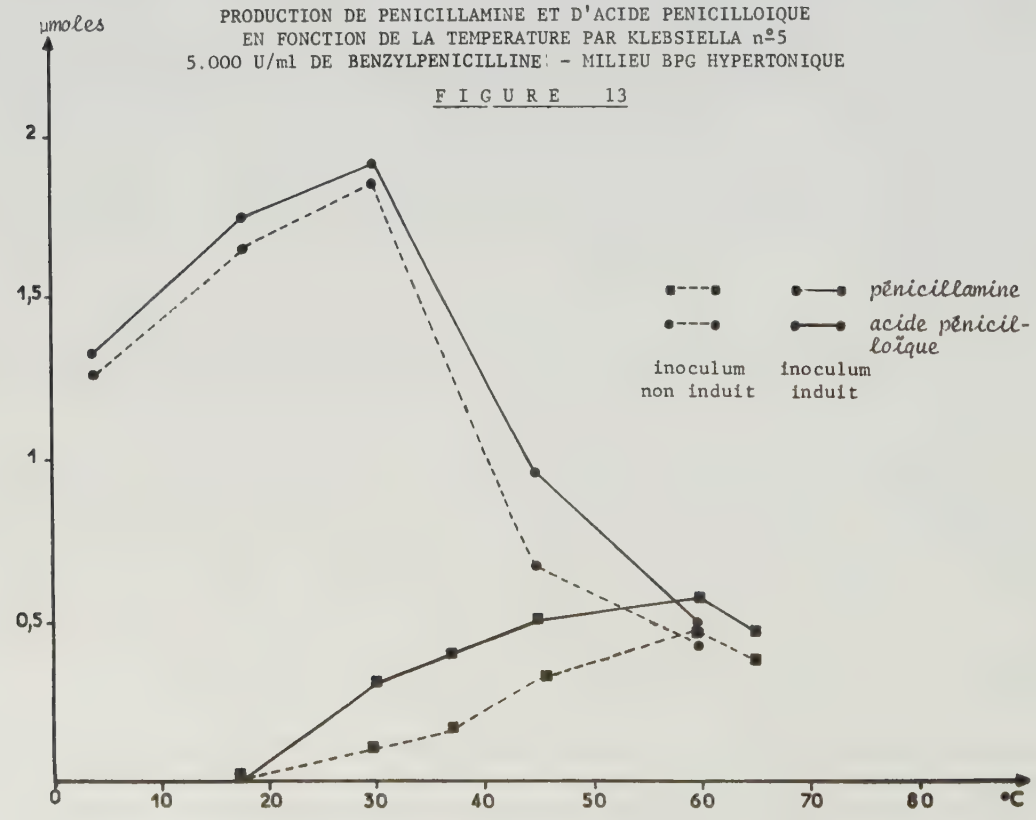
Des témoins de Pénicilline G ont subi les mêmes conditions thermiques. Jusqu'à 60°C, la pénicilline n'a jamais été, même après 72 heures de culture, hydrolysée spontanément en pénicillamine. A partir de 70°C, la Pénicilline G est spontanément dégradée en pénicillamine. Les quantités formées sont faibles, de l'ordre de 20 à 25 µg par ml, mais empêchant toute expérimentation. Ainsi seule une gamme comprise entre + 4°C et 65°C sera étudiée.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans le tableau 21 et la figure 13. Ils sont assez décevants car nous n'avons pas pu mettre en évidence d'optimum thermique. La production de pénicillamine est toujours négative si les températures d'incubation sont inférieures à 30°C. Il en est de même si les souches sont portées



PRODUCTION DE PENICILLAMINE ET D'ACIDE PENICILLOIQUE
EN FONCTION DE LA TEMPERATURE PAR KLEBSIELLA n°5
5.000 U/ml DE BENZYLPENICILLINE - MILIEU BPG HYPERTONIQUE

FIGURE 13



PRODUCTION DE PENICILLAMINE ET D'ACIDE PENICILLOIQUE
EN FONCTION DE LA TEMPERATURE PAR KLEBSIELLA 418
5.000 U/ml DE BENZYLPENICILLINE - MILIEU BPG HYPERTONIQUE

FIGURE 14

quelques minutes au bain-marie bouillant avant d'être introduites dans les milieux de culture contenant la pénicilline.

CULTURE 24 H.	PENICILLINE G.		AC. PENICILLOIQUE	
Température	Germes N	Germes I	Germes N	Germes I
+ 4°C.	0	0	0	0
+ 18°C	0	0	0	0
+ 30°C	0	16	0	0
+ 37°C	23	33	12	17
+ 45°C	26	36	0	0
+ 60°C	45	56	0	0
B.M.Bouillant	0	0	0	0

Tableau 21 - Production de pénicillamine par Klebsiella n°5 à partir de benzylpénicilline et d'acide benzylpénicilloïque en fonction des variations de température.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µg par ml .

Germes N = germes non induits.
Germes I = germes induits.

La pénicillamine apparaît dans les milieux à des températures d'incubation différentes selon que la souche est induite par la pénicilline ou non. Avec un inoculum normal, elle apparaît à 37°C, avec un inoculum induit dès 30°C. Au delà de ces températures limites d'incubation, les quantités de pénicillamine produites vont aller en augmentant progressivement jusqu'à 60°C. Puis jusqu'à 70°C, la production plafonne et tend à décroître. Dans toute l'expérience, les témoins pénicilline n'ont jamais été dégradés en pénicillamine, mais dès 50°C, la pénicilline est instable en solution aqueuse (212). Aussi sommes-nous dans l'incapacité de savoir si la diminution de production de la pénicillamine obtenue entre 60 et 70°C est due à une diminution d'activité enzymatique ou à la dégradation spontanée du substrat.

Les très faibles quantités de pénicillamine dosées dans chaque tube semblent indiquer que le métabolisme microbien est indispensable pour obtenir une bonne production. En milieu B.P.G. normotonique à inoculum et quantité de pénicilline égales, *Klebsiella* n°5 produit 140 µg par

ml après 24 heures de culture à 37°C.

Donc la seule conclusion que nous puissions tirer de cette expérience est la dissociation nette entre l'optimum thermique de la β lactamase qui se situe à 30°C (221) et celui de l'activité responsable de la formation de pénicillamine qui est au moins supérieur à 37°C.

Si la benzylpénicilline est très sensible aux fortes températures, l'acide bensylpénicilloïque lui, est stable. Aussi avons-nous refait la même expérience avec ce substrat.

Dans ces conditions, la pénicillamine apparaît exclusivement dans les tubes placés à 37°C (tableau 21).

Cette experience est assez intéressante car elle permet de constater que :

1°. Des germes immergés 1, 2, 3, 4 ou 5 minutes au bain-marie bouillant sont incapables de produire de la pénicillamine lorsqu'ils sont ultérieurement placés dans les conditions de production les plus favorables. Donc les températures élevées altèrent les systèmes responsables de la formation de pénicillamine. Ceci n'est pas en faveur d'une hydrolyse spontanée de la pénicilline responsable de l'apparition de ce métabolite.

2°. Les activités responsables de la formation d'acide pénicilloïque et de pénicillamine ayant des optimums thermiques différents, on peut affirmer qu'elles sont réellement indépendantes l'une de l'autre.

3°. En culture, les quantités de pénicillamine obtenues par hydrolyse bactérienne de l'acide benzylpénicilloïque sont supérieures à celles obtenues à partir de la benzylpénicilline. Avec les germes au repos, elles sont très faibles et inférieures à celles dosées à partir de la benzylpénicilline. Le métabolisme microbien semble très important sinon indispensable pour obtenir une bonne production de pénicillamine.

Dans cette expérimentation, il semble que la production de pénicillamine à partir de la benzylpénicilline et de l'acide pénicilloïque correspondant n'obéit pas aux mêmes impératifs thermiques. Pourrait-on admettre l'existence de deux processus enzymatiques indépendants et spécifiques responsables de la formation de pénicillamine ?

b) - Klebsiella 418.

L'étude de la production de pénicillamine par *Klebsiella* 418 dans les mêmes conditions de culture que précédemment, nous conduit aux mêmes conclusions que celles établies avec *Klebsiella* n°5. C'est ce que montrent le tableau 22 et la figure 14.

CULTURE 24 H	PENICILLINE G		ACIDE PENICILLOIQUE	
Température	Germes N	Germes I	Germes N	Germes I
+ 4°C	0	0	0	0
+ 18°C	0	0	0	0
+ 30°C	15	30	10	12
+ 37°C	26	39	18	22
+ 45°C	38	49	0	0
+ 60°C	45	57	0	0
B.M.bouillant	0	0	0	0

Tableau 22 - Production de pénicillamine par klebsiella 418 à partir de la benzylpénicilline et d'acide benzylpénicilloïque en fonction des variations de température.

Les quantités de pénicillamine sont exprimées en µ g par ml.

Germes N = germes non induits
Germes I = germes induits.

1 - En présence de 2.500 µg par ml de benzylpénicilline.

Les suspensions bactériennes traités au préalable une minute ou plus au bain-marie bouillant sont incapables de produire de la pénicillamine. Il en est de même des suspensions bactériennes traitées aux basses températures. A 30°C, les souches de *Klebsiella 418* sont capables induites ou non induites, d'en faire apparaître de faibles quantités, la production étant supérieure avec les souches induites. Aucun optimum thermique n'a pu être mis en évidence : aux températures supérieures à 37°C, la courbe tend vers un plateau jusqu'à 60°C. La β lactamase de la souche montre un optimum thermique à 30°C.

2 - En présence de 2.500µg par ml d'acide benzylpénicilloïque

La pénicillamine apparaît dans les tubes cultivés à 30°C et 37°C , le maximum de rendement étant obtenu à 37°C.

Ces résultats permettent d'établir les mêmes conclusions que précédemment.

- inhibition de la production par traitement des souches au bain-marie bouillant,

- dissociation de la β lactamase et de l'activité responsable de la formation de pénicillamine,

- le métabolisme bactérien est nécessaire à une bonne production,

- il pourrait y avoir deux activités différentes responsables de la production de pénicillamine.

3 - Influence du chloramphénicol.

Dans une série de tubes contenant du milieu de Monod glucosé et saccharosé, nous avons mis en présence 5 mg de poids sec de bactéries par ml, 2.000 unités par ml de pénicilline et des concentrations décroissantes de chloramphénicol, la concentration maximum étant de 200 µ g par ml. Une série de tubes sans chloramphénicol a servi de témoin.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la technique de PAL révèle dans les tubes témoins ensemencés par *Klebsiella* n°5 la présence de 35 µg par ml de pénicillamine et de 50 µg par ml dans ceux de *Klebsiella* 418. En présence de chloramphénicol le dosage de PAL est perturbé par un précipité blanc et la coloration bleue caractéristique est fugace. La pénicillamine a été recherchée et estimée quantitativement par chromatographie sur papier. Chaque échantillon a été passé sur une petite colonne Amberlite I.R. 400, lavé à l'eau bidistillée bouillie pour éliminer le saccharose. La pénicillamine a été ensuite éluée sélectivement dans le front d'élution d'une solution HCl N.

Le chloramphénicol inhibe la production de pénicillamine dès la concentration de 3,8 µ g par ml. Aux concentrations inférieures, le spot de pénicillamine apparaît sur les chromatogrammes. Ceci est valable pour les deux germes.

Démontrer que la production de pénicillamine est inhibée par le chloramphénicol, c'est prouver qu'elle est sensible à un inhibiteur de la synthèse protéique. Elle pourrait donc être dépendante d'une activité enzymatique.

CONCLUSION.

De cette étude, nous pouvons conclure que :

1°. la pénicillamine n'est pas le produit d'une hydrolyse spontanée de la pénicilline dans les hydrolysats bactériens puisqu'il faut une température de 70°C maintenue 24 heures pour dégrader ainsi les

témoins pénicilline. D'autre part, les milieux ensemencés avec des germes tués ou conservés à + 4°C n'en produisent jamais. Donc la formation de pénicillamine est bien le résultat d'une hydrolyse bactérienne. Elle semble même être étroitement liée au métabolisme microbien car le rendement en pénicillamine est supérieur à 85 pour cent si on utilise des germes en croissance au lieu de germes au repos.

2°. la production de pénicillamine est un phénomène qui peut être inductible. Certaines souches sont sensibles à l'induction par 1µg par ml de benzylpénicilline et 2µg par ml d'acide benzylpénicilloïque.

3°. cette production est indépendante de la présence d'une β lactamase car nous avons montré que :

a) des germes dépourvus de β lactamase produisent de la pénicillamine et sont sensibles à l'induction,

b) des germes pourvus de βlactamase constitutive peuvent ne pas produire de pénicillamine.

c) des germes possèdant des β lactamases constitutives peuvent produire de la pénicillamine, le processus de formation pouvant être sensible ou indifférent à l'induction.

d) et enfin, des germes possédant une β lactamase inductible peuvent avoir une production de pénicillamine totalement insensible à l'induction.

Les deux systèmes peuvent donc s'exprimer l'un sans l'autre ou indifféremment. Il semble d'autre part que les deux optimums thermiques des deux activités sont différents. Les deux systèmes sont donc totalement indépendants. Il était important de le démontrer puisque l'acide benzylpénicilloïque est un bien meilleur substrat que la benzylpénicilline. La présence d'une βlactamase pouvait être responsable d'un meilleur rendement de la production.

4°. la production de pénicillamine est inhibée par le chloramphénicol donc par un inhibiteur de la synthèse protéique.

Cet ensemble d'arguments amène à penser que la production de pénicillamine est sous dépendance enzymatique. Un seul processus est-il responsable de cette formation ? Pouvons-nous admettre un processus capable de dégrader l'acide benzylpénicilloïque ? Pour le prouver, nous tenterons ultérieurement d'isoler les systèmes responsables. Pour l'instant dans le chapitre suivant, nous essaierons de définir les quantités de pénicilline dégradées en pénicillamine.

---°---

Chapitre V

RAPPORTS ENTRE LA DEGRADATION DE LA PENICILLINE ET LA FORMATION DE LA PENICILLAMINE

Dans ce chapitre, nous voulons définir quelle est la quantité réelle de pénicilline dégradée en pénicillamine.

Nous nous sommes heurtés à quelques difficultés.

1 - la production de pénicillamine est tardive et brutale, dans les conditions habituelles. La cinétique de la dégradation de la pénicilline en pénicillamine est impossible à établir dans les premières heures de culture.

2 - la benzylpénicilline a la propriété de se fixer in vivo sur les protéines sanguines. BENAZET et ses collaborateurs (19) ont montré que cette fixation est immédiate, reversible et affecte 59 pour cent de la quantité introduite. Par dosages iodométriques, nous avons montré que les peptones du bouillon B.P.G. en fixaient 27 pour cent après 10 minutes de contact. Comme la croissance bactérienne entraîne une métabolisation de peptones, nous ne savons pas ce que devient dans le temps le coefficient de fixation de la benzylpénicilline. Donc, seuls les milieux de culture où la pénicilline est dégradée rapidement pourront permettre de calculer la quantité réelle dégradée en pénicillamine.

C'est pour cette raison que l'hydrolyse de la pénicilline par les Salmonelles n'a pas été étudiée car la dégradation est trop lente dans le temps. Ceci est regrettable car ces germes étant dépourvus de β lactamase et d'acylase, devraient théoriquement dégrader toute la pénicilline en pénicillamine. Les entérobactéries étudiées capables de répondre à l'impératif précédent, sont les Klebsielles n°5 et 418. Ces germes possèdent une β lactamase et la pénicilline introduite sera soumise à deux métabolismes, peut être différents et même compétitifs, l'un aboutissant à l'acide pénicilloïque, l'autre à la pénicillamine.

Le mécanisme ne sera donc pas étudié à l'état pur. Cependant, même si les rapports que nous allons établir sont assez théoriques, ils sont néanmoins intéressants.

I. RESULTATS.

L'hydrolyse bactérienne a été suivie en effectuant les dosages à des intervalles de temps donnés.

Par dosages iodométriques, deux paramètres ont été déterminés.

- la quantité d'acide pénicilloïque formée : (Ac. P.)
- la quantité de pénicilline restante : (P.G.R.)

Par la technique de PAL, les quantités de pénicillamine formées ont été dosées.

A partir de ces données, deux valeurs ont été calculées :

- la quantité totale de pénicilline dégradée (P.G.D.). C'est la différence entre la quantité totale de pénicilline introduite au temps to (P.G.) et la quantité de pénicilline restante (P.G.R). Cette valeur est arbitraire car nous n'avons pas tenu compte des 27 pour cent de pénicilline fixés par le milieu.

- la quantité de pénicilline disparue, qui ne se dose ni sous forme de pénicilline intacte, ni sous forme d'acide pénicilloïque. C'est la quantité x de pénicilline qui va nous intéresser ; elle est obtenue par différence entre la pénicilline totale dégradée (P.G.D.) et l'acide pénicilloïque formé (Ac. P.).

A. ETUDE DE LA DEGRADATION DE 2,9 µMOLES DE BENZYLPENICILLINE PAR LES KLEBSIELLAE EN MILIEU B.P.G. HYPERTONIQUE.

Les tableaux 23 et 24 présentent les différents résultats de l'hydrolyse de 2.000 unités par ml soit 2,9 µ moles de benzylpénicilline par *Klebsiella* n°5 et *Klebsiella* 418. Ces résultats montrent que :

1) dans les deux milieux de culture, la Pénicilline G est fortement dégradée puisqu'après 15 h 30 de culture, il ne reste plus que 0,11 et 0,20 µ moles de pénicilline. Au-delà de 15 h 30, il apparaît que de faibles quantités de pénicilline subsistent longtemps. Dans le milieu ensemencé par *Klebsiella* n°5, la quantité de pénicilline dosée à la 21ème heure est supérieure à celle dosée à la 15ème heure. Cette augmentation est peut-être due à un relargage secondaire de la pénicilline fixée .

2) Les quantités d'acide pénicilloïque formées augmentent fortement jusqu'à la 15ème heure. Puis nous observons une diminution des quantités, diminution plus marquée dans les milieux ensemencés par *Klebsiella* 418.

3) La quantité de pénicilline disparue, définie par (P.G.D.- Ac. P) semble très importante et augmente jusqu'à la 48ème heure. C'est cette quantité qui peut être transformée en pénicillamine. Ainsi , si tous les métabolites étaient dosables et stables, la somme (P.G.R. + Ac.P. + Pénicillamine) devrait être égale à la quantité totale de Pénicilline G introduite au temps 0, c'est-à-dire 2,9 µ moles par ml.

GERMES A 37°C.		P.G.R.	P.G.D.	Ac. P.	P.G.D. -Ac.P.	Pénicil lamine	P.G.D.-Ac.P. / Pénicillamine
	0	2,9					
	10min	2,21					
	3 h	1,79	1,11	0,62	0,49	0	-
Klebsiella	5 h	1,60	1,30	0,67	0,63	0	-
n° 5	15h30	0,11	2,78	1,71	1,07	0	-
	21 h	0,27	2,62	1,56	1,06	0,08	13,32
	24 h	0,08	2,82	1,56	1,26	0,16	7,87
	48 h	0,02	2,88	1,50	1,38	0,21	6,56

Tableau 23 - Dégradation de 2,9 µmoles de benzylpénicilline par klebsiella n°5 en milieu B.P.G. hypertonique.

Toutes les quantités sont exprimées en µmoles par ml.

P.G.R. = quantité de pénicilline restante ; P.G.D. = quantité de pénicilline dégradee ; Ac.P. = acide benzylpénicilloïque formé.

GERMES A 37°C.		P.G.R.	P.G.D.	Ac. P.	P.G.D. -Ac. P.	Pénicil lamine	P.G.D.-Ac.P. / Pénicillamine
	0	2,9					
	10min	2,20					
	3 h	2,17	0,73	0,32	0,41	0	-
Klebsiella ae	5 h	1,16	1,74	1	0,74	0	-
rogenes 418	15h30	0,20	2,7	1,71	1	0	-
	21 h	0,15	2,75	1,64	1,11	0,10	11,1
	24 h	0,14	2,76	1,46	1,30	0,18	10
	48 h	0,06	2,84	1,12	1,72	0,25	6,88

Tableau 24 - Dégradation de 2,9 µmoles de benzylpénicilline par Klebsiella 418 en milieu B.P.G. hypertonique

Toutes les quantités sont exprimées en µ moles/ml.

P.G.R.= quantité de pénicilline restante ; P.G.D.= quantité de pénicilline dégradée ; Ac.P.= acide benzylpénicilloïque formé .

Or, dans les milieux de culture ensemencés par *Klebsiella* n°5 après 21 heures de culture, nous trouvons : 1,91 µ moles par ml.
" 24 " " " " " 1,80 " " "
" 48 " " " " " 1,72 " " "

Une assez forte quantité de pénicilline semble donc avoir entièrement disparu .

L'hydrolyse de la pénicilline par *Klebsielle* 418 donne les mêmes résultats.

Pour préciser cette notion, nous avons établi le rapport entre la quantité de pénicilline disparue (P.G.D. - Ac. P.) et la quantité de de pénicillamine formée. Si 1 mole de pénicilline est entièrement dégradée en 1 mole de pénicillamine, le rapport théorique P.G./Pénicillamine = 2,37. Si toute la quantité de pénicilline disparue avait été transformée en pénicillamine, le rapport P.G.D. - Ac. P./Pénicillamine devrait être égal à cette valeur.

Dans le tableau 23, indiquant les résultats de l'hydrolyse de la pénicilline par Klebsielle n°5, il apparaît que dans le temps, le rapport $\frac{\text{P.G.D. - Ac. P.}}{\text{Pénicillamine}}$ est de 13,32 après 24 heures d'incubation et devient égal à 6,56 après 48 heures. Cette dernière valeur est très éloignée de la valeur théorique. Dans le tableau 24 où les résultats obtenus avec Klebsiella 418 sont inscrits, il apparaît que le rapport est au mieux égal à 6,88. Donc nous pouvons conclure que toute la pénicilline qui apparemment a disparu puisqu'elle n'est plus dosable sous aucune forme, n'a pas été transformée en pénicillamine.

B. ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA PENICILLINE G PAR LES SOUCHES DE KLEBSIELLES PREALABLEMENT INDUITES.

Les tableaux 25 et 26 présentent les résultats de l'hydrolyse de 2,9 µg par ml de pénicilline en milieu B.P.G. hypertonique par des inoculums de Klebsielles préalablement induits par 1 µg par ml de benzylpénicilline. (voir tableaux 25 et 26 page suivante).

En comparant les résultats présentés dans les tableaux 23 - 24 et 25 - 26, nous constatons que :

1° - la Pénicilline G est dégradée avec la même vitesse et la même intensité par la souche induite et non induite. Dans les bouillons de *Klebsiella* n°5 la même légère augmentation de la quantité de pénicilline dosable est observée à la 21ème heure.

2° - les quantités d'acide pénicilloïque formées sont égales.

3° - les quantités de pénicilline restantes sont comparables.

Donc les quantités de pénicilline disparues sont semblables . Mais le rapport P.G.D. - Ac. P/Pénicillamine sera différent puisque les quantités de pénicillamine formées sont supérieures lorsque les souches sont induites.

Germes à 37°C		P.G.R.	P.G.D.	Ac. P.	P.G.D. -Ac. P.	Pénicil lamine	P.G.D.-Ac. P. / pénicillamine
	0	2,9					
	10mn	2,21					
	3h	1,65	1,25	0,63	0,62	0	-
Klebsiella	5h	1,31	1,59	0,70	0,89	0	-
N°5	15h30	0,085	2,81	1,90	0,91	0	-
	21h	0,26	2,64	1,50	1,14	0,09	12,6
	24h	0,09	2,81	1,50	1,31	0,19	6,9
	48h	0,04	2,86	1,36	1,50	0,33	4,54

Tableau 25 - Dégradation de 2,9 µ moles de benzylpénicilline par Klebsiella n°5 préalablement induite en milieu B.P.G. hypertonique.

Toutes les quantités sont exprimées en µ moles/ml.

P.G.R.= quantité de pénicilline restante ; P.G.D.= quantité de pénicilline dégradée ; Ac.P. = acide benzylpénicilloïque formé.

Germes à 37°C.		P.G.R.	P.G.D.	Ac. P.	P.G.D. -Ac. P.	Pénicil lamine	P.G.D.-Ac. P. / pénicillamine
	0	2,9					
	10mn	2,21					
	3 h	2,12	0,78	0,36	0,42	0	-
	5 h	1,08	1,82	1,08	0,74	0	-
	15h30	0,20	2,7	1,82	0,88	0	-
	21 h	0,15	2,75	1,74	1,01	0,12	8,41
	24 h	0,14	2,76	1,42	1,34	0,20	6,7
	48 h	0,02	2,88	1,05	1,83	0,39	4,69

Tableau 26 - Dégradation de 2,9 µ moles de benzylpénicilline par Klebsiella 418 préalablement induite en milieu B.P.G. hypertonique.

Toutes les quantités sont exprimées en µ moles/ml.

P.G.R. = quantité de pénicilline restante ; P.G.D. = quantité de pénicilline dégradée ; Ac. P. = acide benzylpénicilloïque formé.

Avec la souche *Klebsiella* 418, le rapport après 48 heures de culture est de 4,69, avec celle de Klebsiella n°5 de 4,54.

Donc, une plus grande partie de pénicilline a été transformée en pénicillamine après 48 heures de culture, par les souches préalablement induites.

L'étude comparée de l'hydrolyse bactérienne de 2,9µmoles de pénicilline en milieu hypertonique par deux souches de Klebsielles produisant de la pénicillamine montre de légères différences.

1°. Après la 21ème heure, nous ne trouvons pas dans les milieux de *Klebsiella* 418, les mêmes variations des quantités de P.G.R. que celles observées dans les milieux de *Klebsiella* n°5.

2°. Après la 21ème heure, dans les milieux ensemencés avec *Klebsiella* 418, les quantités d'acide pénicilloïque décroissent de 1,74 à 1,05 µ moles par ml. Elles restent stables dans ceux ensemencés avec *Klebsiella* n°5.

3°. Les rapports P.G.D. - Ac. P/pénicillamine sont plus élevés à 21 heures et plus faibles à 48 heures dans les milieux de *Klebsiella* n°5 que dans ceux de *Klebsiella* 418.

C. ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA PENICILLINE G PAR LES KLEBSIELLES EN MILIEU B.P.G. NORMOTONIQUE.

Les tableaux 27 et 28 présentent les résultats de l'hydrolyse de 2,9 µmoles par ml de Pénicilline G par les deux Klebsielles en milieu B.P.G. isotonique. Seule *Klebsiella* n°5 produit, dans ces conditions de tonicité, de la pénicillamine. Nous allons donc comparer deux tableaux d'hydrolyse dont un seul aboutit à la production de pénicillamine.

Nous observons que :

1°. Si les vitesses d'hydrolyse de la pénicilline sont différentes entre les deux souches, après 15 h 30 de culture, les quantités de pénicilline dégradées et d'acide pénicilloïque formé sont très voisines.

2°. De 15 h 30 à 24 heures, dans les milieux de *Klebsiella* 418, les quantités de P.G.R. demeurent constantes. Au contraire, dans ceux de *Klebsiella* n°5, les quantités augmentent de 0,11 à 0,30 µ moles par ml.

3°. De 15 h 30 à 24 heures, dans les hydrolyses de *Klebsiella* n°5, les quantités d'acide pénicilloïque formées demeurent constantes. Dans les hydrolyses de *Klebsiella* 418, les quantités diminuent de 1,74 à 1,46 µ moles par ml. Entre 24 et 48 heures, les taux baissent dans les deux cas.

Il semble donc qu'il existe peu de différences dans l'étude comparative des produits d'hydrolyse de la pénicilline, puisque le même profil de dégradation est obtenu en milieu hyper et isotonique. Or, dans le cas de *Klebsiella* 418, selon la tonicité du milieu, la production de pénicillamine est positive ou négative.

Germes à 37°C.		P.G.R.	P.G.D.	Ac. P.	P.G.D. -Ac. P.	Pénicil lamine	P.G.D.-Ac. P. / pénicillamine
	0	2,9					
	10mn	2,21					
	3 h	1,94	0,96	0,24	0,81	0	-
Klebsiella ae-	5 h	0,97	1,93	1,13	0,80	0	-
rogenes 418	15h30	0,27	2,63	1,73	0,90	0	-
	21 h	0,27	2,63	1,76	0,86	0	-
	24 h	0,26	2,64	1,79	0,84	0	-
	48 h	0,16	2,74	1,46	1,28	0	-

Tableau 27 - Dégradation de 2,9 µmoles de benzylpénicilline par Klebsiella 418 en milieu B.P.G. normotonique.

Toutes les quantités sont exprimées en µ moles/ml.

P.G.R.= quantité de pénicilline restante ; P.G.D. = quantité de pénicilline dégradée ; Ac. P. = acide benzylpénicilloïque formé.

Germes à 37°C.		P.G.R.	P.G.D.	Ac. P.	P.G.D. -Ac. P.	Pénicil lamine	P.G.D.-Ac. P. / pénicillamine
	0	2,9					
	10mn	2,20					
	3 h	1,38	1,52	0,86	0,66	0	-
Klebsiella	5 h	0,11	2,79	1,85	0,94	0	-
n° 5	15h30	0,11	2,79	1,77	1,02	0	-
	21 h	0,27	2,63	1,94	0,80	0,065	12,3
	24 h	0,30	2,60	1,94	0,66	0,07	9,4
	48 h	0,16	2,74	2,32	0,42	0,09	4,6

Tableau 28 - Dégradation de 2,9 µ moles de benzylpénicilline par Klebsiella n°5 en milieu B.P.G. normotonique.

Toutes les quantités sont exprimées en µ moles/ml.

P.G.R. = quantité de pénicilline restante ; P.G.D. = quantité de pénicilline dégradée ; Ac. P. = acide benzylpénicilloïque formé.

Cependant, il ressort de ceci que deux germes, possédant théoriquement le même équipement enzymatique capable de dégrader la pénicilline, montrent lors de l'étude comparée dans le temps des produits d'hydrolyse formés des différences appréciables. Il est en effet remarquable que :

a) quelles que soient les conditions de tonicité et de culture, il n'y a que dans les milieux ensemencés par *Klebsiella* n°5, après 21 h de culture, une nette réapparition de pénicilline.

b) il n'y a que dans les milieux ensemencés par *Klebsiella* 418, à partir de la 21ème heure de culture, une diminution progressive d'acide pénicilloïque.

Ces deux phénomènes ont-ils un rapport quelconque avec la production de pénicillamine ?

Beaucoup plus intéressante est l'étude du rapport P.G.D.-Ac.P/ Pénicillamine. En effet, il apparaît qu'en milieu iso ou hypertonique, Klebsiella n°5 dégrade la pénicilline en pénicillamine avec un rendement très comparable, même si les quantités de pénicillamine dosées dans les milieux sont très différentes. Cependant, même après 48 heures de culture, c'est-à-dire au moment où la production de pénicillamine est maximum, il apparaît que ce rapport demeure très éloigné du rapport théorique idéal. Pourtant leur estimation va apporter des données nouvelles dans l'expérimentation suivante.

L'hypothèse de départ est la suivante : J. LATRILLE (129) étudiant les sphéroplastes pénicilline d'*Escherichia coli* O_{111} B_4, avait noté que c'est à partir de la 18ème heure que les ghosts commencent à apparaître dans les milieux. Nous nous sommes demandé si la production brutale de pénicillamine ne serait pas en rapport avec la lyse bactérienne.

Une première constatation expérimentale nous avait déjà fait entrevoir qu'une certaine quantité de pénicillamine formée devait rester liée aux germes. En effet, en éliminant les germes par centrifugation des milieux de culture, cela diminuait les quantités de pénicillamine dosée. Par exemple dans les milieux de culture d'*Escherichia coli* O_{111} B_4, 10 minutes de centrifugation à 4.000 tours/minute diminuaient de 40 pour cent les quantités dosées. L'effet était plus faible dans les milieux ensemencés par *Klebsiella* n°5 puisque les quantités de pénicillamine diminuaient seulement de 52 µg par ml à 38 µg par ml. Dans les milieux ensemencés par *Klebsiella* 418, elles passent de 55 à 50 µg par ml. Mais il semble bien qu'une certaine quantité de pénicillamine soit liée aux germes.

Aussi, pour vérifier cette hypothèse, nous avons lysé mécaniquement les germes, soit avant, soit après l'apparition de la pénicillamine, et nous avons cherché si dans le premier cas, nous provoquions son apparition, et dans le deuxième cas, nous augmentions les quantités produites.

D. LYSE BACTERIENNE.

Les cultures ont été soumises aux ultra-sons dans un appareil M.S.E. donnant une puissance de 60 watts et une fréquence de 20 Kc/seconde. Le temps d'exposition aux ultra-sons est très limité, car la pénicillamine est très vite dégradée, sans doute par oxydation.

a - Effet des ultra-sons après 24 heures de culture.

Une culture de *Klebsiella* n°5 et de *Klebsiella* 418 en milieu B.P.G. hypertonique contenant 1.000 µ g par ml de pénicilline a été directement traitée une minute, puis deux minutes trente secondes aux ultra-sons.

Comme le montre le tableau 29, la sonnation augmente fortement les quantités de pénicillamine dans les milieux de culture : 42 pour cent dans ceux de *Klebsiella* 418, 36 pour cent dans ceux de *Klebsiella* n°5. Ces chiffres sont certainement inférieurs à la réalité, car l'expérience montre que la pénicillamine disparaît rapidement sous l'action des ultra-sons. Pourtant si nous calculons le rapport

$$\frac{\text{P.G.D. - Ac. P.}}{\text{Pénicillamine}}$$

nous observons que :

- pour *Klebsiella* n°5, le rapport de 6,56 devient égal à 3,73
- pour *Klebsiella* 418, " " " 6,88 " " " 3,59

Ainsi *Klebsiella* 418 libère sous l'action des ultra-sons plus de pénicillamine que *Klebsiella* n°5.

La même expérience a été faite avec les mêmes souches, mais induites au préalable par 1 µ g par ml de pénicilline. Les rapports calculés sont alors les suivants :

- pour *Klebsiella* n°5 le rapport de 4,54 devient égal à 3,54.
- pour *Klebsiella* 418 le rapport de 4,67 devient égal à 2,70.

Ce dernier rapport est très proche du rapport idéal théorique qui est de 2,37. Même s'il est lui-même théorique, il permet de montrer que :

1°. Lorsque une souche possède une β lactamase, toute la quantité de pénicilline qui n'est pas transformée en acide pénicilloïque, est transformée presque totalement en pénicillamine.

2°. La production de pénicillamine semble bien être dépendante de la lyse bactérienne, donc la formation de pénicillamine pourraît être d'origine endogène.

GERMES	Milieu centrifugé	Milieu + germes	Milieu traité aux ultra-sons 1 mn	Milieu traité aux ultra-sons 2mn30
Klebsiella N°5	39 µg/ml = 0,26	42 µ g/ml = 0,28	55 µg/ml = 0,37	42 µ g/ml = 0,28
Klebsiella 418	50 µg/ml = 0,33	55 µ g/ml = 0,37	71 µg/ml = 0,48	62 µ g/ml = 0,41

Tableau 29 - Lyse bactérienne et production de pénicillamine.

Milieu B.P.G., hypertonique - culture de 24 heures en présence de 2.000 U/ml de benzylpénicilline.

Les résultats sont exprimés en µg/ml et en µmoles/ml.

3°. Ce phénomène est reproductible sur tous les germes testés, avec des intensités variables. Dans une culture de Citrobacter effectuée dans les mêmes conditions, les ultra-sons augmentent le rendement de la production de pénicillamine de 40 pour cent, dans une culture d'Escherichia coli O_{111} B_4 de 61 pour cent.

b) Effet des ultra-sons après 6 heures de culture.

La même expérience a été faite en milieu B.P.G. hypertonique contenant 4.000 µg par ml de pénicilline ensemencée soit par *Klebsiella* n° 5 *Klebsiella* 418 et *Escherichia coli* O_{111} B_4 . Dans ces conditions de culture, la pénicillamine apparaît dès la 6ème heure, dans les deux milieux ensemencés par *Klebsiella* n°5 et *Klebsiella* 418. *Escherichia coli* O_{111} B_4 produit plus tardivement la pénicillamine. Aussi le traitement aux ultra-sons aura lieu à cette 6ème heure précise et nous pourrons ainsi montrer que :

1 - les ultra-sons augmentent la quantité de pénicillamine dans les milieux où elle est déjà présente.

2 - ils provoquent l'apparition de pénicillamine dans des milieux où elle n'était pas encore dosable.

En effet, les résultats sont les suivants :

	E.coli O_{111} B_4 *n°3*	*E. coli normaflore n°20*	*Citrobacter N°30*	*Klebsiella n° 5*	*Klebsiella 418*
Avant traitement aux ultra-sons	0	0	0	21	24
Après traitement aux ultra-sons	26	32	25	29	32

Tableau 30 - Production de pénicilllamine et lyse microbienne.

Milieu B.P.G. hypertonique contenant 8.000 U/ml de benzylpénicillamine. Culture de 6 heures.

Les résultats sont exprimés en µ g/ml de pénicillamine.

Il apparaît donc nettement que la quantité de pénicillamine dosée est dépendante de la lyse bactérienne et surtout que la pénicillamine est formée beaucoup plus précocement dans les germes que ne le laissaient supposer tous les premiers dosages.

II. CONCLUSION.

Bien que le phénomène n'ait pu être étudié à l'état pur, il semble que les conclusions auxquelles on arrive sont particulièrement intéressantes.

Il apparaît en particulier que :

1°. Deux germes ayant une β lactamase d'activité comparable ne donnant pas dans le temps, en milieu isotonique, comme en milieu hypertonique, un profil comparable de dégradation de la pénicilline. En particulier, il apparaît nettement que *Klebsiella* 418 métabolise secondairement l'acide pénicilloïque formé. La souche possède donc au moins une activité enzymatique inconnue capable de dégrader un produit d'hydrolyse de la pénicilline.

2°. En établissant le rapport entre la quantité totale de pénicilline dégradée en autre chose que l'acide pénicilloïque et la quantité de pénicillamine formée, on observe que :

a - si le rapport est calculé directement sur les valeurs dosées dans le milieu de culture, le résultat obtenu est assez éloigné du résultat théorique idéal.

b - si le rapport est calculé sur les valeurs dosées dans le milieu de culture, après lyse mécanique des germes, le rendement obtenu est nettement meilleur. Les causes d'erreurs par défaut sont nombreuses : les klebsielles ne sont sûrement pas toutes lysées par 2mn30 d'ultra-sons, donc toute la pénicillamine ne doit pas être libérée et d'autre part, les ultra-sons facilitent l'oxydation lente de la pénicillamine. Malgré tout, les résultats sont comparables entre eux, et il est évident que la souche *Klebsiella* 418 donne les meilleurs rendements et c'est la souche qui métabolise secondairement l'acide pénicilloïque. Est-ce un argument supplémentaire capable d'étayer l'hypothèse qui voudrait qu'il y ait deux activités enzymatiques capables de produire de la pénicillamine, l'une à partir de la benzylpénicilline, l'autre à partir de l'acide pénicilloïque correspondant ?

3°. La lyse mécanique d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 dans certaines conditions précises de culture, nous amène à une constatation qui nous paraît fondamentale. Il est possible de provoquer l'apparition de la pénicillamine dans les premières heures de culture en cassant les germes. Donc la pénicillamine est présente dans les germes, avant que l'on puisse la doser dans les milieux de culture. Donc c'est dans les germes que la pénicillamine est formée et elle n'est libérée que secondairement et probablement par lyse microbienne.

---°---

RESUME ET CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

L'étude des quantités de pénicillamine apparues à partir de diverses pénicillines dans les différents milieux de culture d'entérobactéries nous permet d'affirmer que ce n'est pas une hydrolyse spontanée de la pénicilline qui est responsable de cette formation. Nous n'avons jamais dosé de pénicillamine dans les milieux témoins non ensemencés, ni dans les milieux ensemencés placés à 4°C ou soumis à de fortes températures.

La pénicillamine est donc un produit d'hydrolyse bactérienne de la pénicilline puisque en fonction des germes et des substrats, les quantités produites ne sont pas comparables. Une spécificité de substrat a pu être mise en évidence avec la souche *Klebsiella* 418. L'importance de la tonicité, ainsi que celle du pH a été mise en évidence avec la souche *Escherichia coli* O_{111} B_4.

Ceci permet de penser que cette production peut être sous dépendance enzymatique. Nous avons démontré que :

1°. les quantités de pénicillamine produites étaient augmentées lorsque l'inoculum avait été traité au préalable par de faibles quantités de pénicilline.

2°. qu'un inhibiteur de la synthèse protéique inhibait cette production.

3°. que la β lactamase n'est absolument pas responsable de la formation de pénicillamine. Le processus responsable de la production de ce dernier métabolite est seul sensible à l'induction par de faibles quantités d'acide pénicilloïque et il possède un optimum thermique différent des pénicillinases.

Il paraît ainsi évident que la production de pénicillamine est un phénomène spécifique dépendant d'une ou de plusieurs activités enzymatiques.

Pourtant les courbes de production de la pénicillamine par *Escherichia coli* O_{111} B_4 n°3 ou par les autres entérobactéries, ne ressemblent guère à une courbe d'hydrolyse enzymatique, en particulier le

temps de latence précédant l'apparition du métabolite est étrangement allongé. D'autre part, les quantités de pénicillamine produites quel que soit le germe ou le substrat proposé oscillent au maximum de 15 à 60 µg par ml, dans les conditions habituelles de culture.

C'est l'estimation de la quantité de pénicilline dégradée en pénicillamine qui nous a permis de trouver une explication à la complexité apparente de ces résultats.

Il avait déjà été observé qu'une partie de la pénicillamine était liée au germe, quantité appréciable par dosage de la molécule directement dans le milieu de culture, puis dans le surnageant de centrifugation. D'autre part, en rapprochant les deux faits suivants : apparition tardive des ghosts dans une population de sphéroplastes pénicilline et apparition tardive et brutale de la pénicillamine, nous avons pensé que les deux phénomènes pouvaient être simultanés et que la lyse microbienne pouvait provoquer la libération de la molécule étudiée. La lyse mécanique des germes a permis de montrer qu'en effet, lors du cassage des germes, il y avait une libération appréciable de pénicillamine dans le milieu extérieur. Donc les dosages de PAL effectués dans le temps, dans les milieux de culture centrifugés donnent des résultats qui ne sont pas le reflet de la production réelle de pénicillamine. L'étude systématique de la dégradation de plusieurs pénicillines par plusieurs entérobactéries, n'a pas été pourtant inutile. Dans chaque cas où la pénicillamine n'a pas été détectée après 48 ou 72 heures de culture dans les milieux, nous avons pu, en cassant les germes, prouver qu'effectivement il n'y avait pas eu production de pénicillamine. Ceci a été fait en particulier avec les sphéroplastes 6 APA d'*Escherichia coli* $O_{111}B_4$ et K_{12}. Donc le 6 APA se présente comme une pénicilline étant incapable d'être métabolisée enzymatiquement en pénicillamine. D'autre part, la lyse mécanique des germes a permis de montrer que la pénicillamine est présente dans les germes, bien avant qu'elle soit présente dans le milieu de culture. Donc le temps de latence pour la production de pénicillamine n'est sans doute qu'apparemment allongé.

Ainsi momentanément, nous sommes dans l'impossibilité de définir la cinétique de l'hydrolyse de la pénicilline en pénicillamine, puisque nous ne pouvons apprécier exactement ni les quantités de substrat dégradé, ni les quantités de pénicillamine formées dans le temps. Pour calculer toutes les constantes et en particulier celle de MICHAELIS, il faudra isoler auparavant le système enzymatique responsable. Ceci sera probablement tenté ultérieurement. Mais il paraît indéniable que la production de pénicillamine est sous une dépendance enzymatique dont la spécificité reste aussi à démontrer.

Avant d'aborder ce problème purement biochimique, nous avons tenu à envisager l'hypothèse suivante. Puisqu'il est vrai que la pénicillamine est de formation précoce et endogène et qu'elle n'est libérée qu'au moment de la lyse microbienne, est-ce qu'elle ne serait pas responsable en partie de cette lyse microbienne ? La molécule de pénicillamine est la

β diméthyl cystéine, elle possède donc trois fonctions particulièrement réactives.

Aussi la deuxième partie de ce travail envisagera l'action propre de la molécule de la pénicillamine :

- Sur la morphologie des entérobactéries,
- Sur la physiologie des entérobactéries,
- Sur l'activité antibiotique des pénicillines.

---°---

DEUXIEME PARTIE

ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES BACTERIES

Chapitre I

LES EFFETS DE LA PENICILLAMINE SUR LA MORPHOLOGIE DES ENTEROBACTERIES : LES SPEROPLASTES PENICILLAMINE

Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré que des quantités appréciables de pénicillamine étaient produites au cours de l'hydrolyse bactérienne de diverses pénicillines.

Ce métabolite d'origine endogène n'est libéré que tardivement dans les milieux de culture.

La molécule de pénicillamine possède trois fonctions particulièrement réactives. Ceci nous a conduit à rechercher si cet amino acide pouvait avoir une action sur la morphologie et la physiologie bactériennes ou s'il se comportait comme un métabolite inerte. Le moyen le plus simple pour répondre à cette question est d'étudier le comportement des germes dans des milieux additionnés de pénicillamine. Mais cette approche est imparfaite, en ce qu'elle ne peut rendre compte que de l'action de la pénicillamine libre dans le milieu, et non de celle de la pénicillamine endogène.

La recherche des modifications de la morphologie et de la physiologie des germes cultivés en présence de pénicillamine, simple en apparence,a présenté néanmoins un certain nombre de difficultés qu'il nous a fallu surmonter.

En 1966, J. LATRILLE,cultivant *Escherichia coli* O_{111} B_4 en milieux hypertoniques additionnés de pénicillamine N.B.C. sous ses différentes formes isomériques, avait observé la présence de germes morphologiquement anormaux. Reprenant les mêmes lots de pénicillamine, nous n'avons pas retrouvé les résultats rapportés par LATRILLE. Avec des pénicillamines plus récentes, d'autre provenance, les résultats ont été inconstants et parfois même négatifs. Seul un échantillon de pénicillamine ALDRICH, de fabrication récente, a donné des résultats relativement satisfaisants.

La cause de ces échecs a été recherchée et la présence d'impuretés dans les échantillons commerciaux a été détectée systématiquement. Aussi la première partie du chapitre sera exclusivement consacrée à l'exposé des techniques de purification des diverses pénicillamines.

- OBTENTION DES PENICILLAMINES -

I. MATERIEL ET METHODES.

A. CONTROLE ET PURIFICATION DES PENICILLAMINES COMMERCIALES.

1 - Différents lots de pénicillamine ont été utilisés.

a) la pénicillamine provenant de la N.B.C.

- D pénicillamine lots 5.334 - 2.999
- L pénicillamine lot 8.094
- DL pénicillamine lot 5.411
- D pénicillamine HCl lots 5.400 - 7.675

b) la pénicillamine ALDRICH.

- D pénicillamine lot O 32.561

2 - Purification des pénicillamines commerciales.

Elle a été faite par chromatographie sur des résines échangeuses d'ions.

1°. résine échangeuse de cations : type Dowex 50
2°. résine échangeuse d'anions : type Amberlite I.R. 400

Les résines sont réparties d'une manière homogène dans une colonne LKB (26 x 410) équipée d'un détecteur U.V. et d'un enregistreur.

a/ Extraction de la pénicillamine sur des résines échangeuses de cations, type Dowex 50, 100 - 200 mesh.

La résine est transformée en sel de sodium par une solution de NaOH N. Au moment de l'emploi elle est lavée à l'eau bidistillée bouillie jusqu'à ce que l'eau, après passage sur la colonne soit neutre.

1.000µg par ml de pénicillamine en solution aqueuse sont fixés sur la colonne par environ 100 ml d'NH_4 OH N/2 . Les U.V. permettent de détecter le passage de la fraction de pénicillamine, qui est identifiée par la technique de PAL. La pureté de la fraction est vérifiée par chromatographie sur papier Whatman n°1 en phase butanol/acide acétique/eau (125-125-30). Le spot est révélé soit à la ninhydrine, soit au nitroprussiate de soude.

Cette méthode a été abandonnée parce que, en milieu alcalin, la fonction -SH de la pénicillamine n'est pas stable. Les quantités dosées par la méthode de PAL et par la micro-méthode de FALS et VEATLE (à la ninhydrine) ne sont pas comparables. L'une dose la fonction -SH, l'autre la fonction -NH_2 de la molécule. En outre, la pénicillamine ainsi éluée en milieu ammoniacal, amenée à pH neutre par une solution d'HCl n'a aucune activité biologique.

Toutes les autres extractions ont été faites avec une résine échangeuse d'anions, la pénicillamine possédant une fonction amphotère est stable sous forme de chlorhydrate de pénicillamine.

b/ Extraction de la pénicillamine sur des résines échangeuses d'anions type Amberlite I.R. 400, 50 - 100 mesh.

Le même matériel L.K.B. est utilisé. La résine est transformée en acide par HCl N, et ne sera lavée à l'eau bidistillée bouillie qu'au moment de l'emploi.

La même quantité de pénicillamine que précédemment est fixée quantitativement sur la colonne. Elle sera éluée par 100 ml d'HCl N. Les diverses fractions éluées sont mises en évidence par les U.V. et l'enregistrement. Elles sont recueillies séparément et identifiées soit colorimétriquement soit par chromatographie sur papier.

B. ISOLEMENT DE LA PENICILLAMINE A PARTIR D'HYDROLYSATS ACIDES DE 6 APA.

Du 6 APA (Sigma lot 55 B 1.550 et Aldrich lot A 70 90) est dissous dans l'eau bidistillée par alcalinisation à la NaOH N, puis amené à pH = 9.

Après 10 minutes, 20 ml de la solution contenant 10.000 µg par ml sont ajustés exactement à pH = 2 par de l'HCl N, hydrolysés à 100°C pendant 1 heure et neutralisés à pH = 7 avec de la NaOH N. Au cours de l'hydrolyse apparaissent des substances chromogènes jaune ou orange, selon le pH, identifiées par GRIGNARD (92),que l'on élimine par chromatographie sur Amberlite comme précédemment, ou par fixation sur Florisil 60 - 100 mesh, placé dans une colonne de 450 x 11 en solution neutre et élution par de l'eau bidistillée. La pénicillamine ainsi extraite est parfaitement pure donnant un spot très homogène à la chromatographie sur papier. Les solutions doivent être utilisées immédiatement.

C. ISOLEMENT ET PURIFICATION DE LA PENICILLAMINE PROVENANT DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE PENICILLOIQUE.

Une suspension dense de *Klebsiella* 418 est obtenue à partir d'une culture de 18 heures, incubée à 37°C en bouillon B.P.G. contenant 2 unités par ml de benzylpénicilline. Elle est centrifugée, lavée deux

fois à l'eau bidistillée stérile, ajustée au spectrophotomètre à 20 mg de poids sec par ml de bactéries et ensemencée en milieu de Monod. Ce milieu est glucosé à 0,5 pour cent, additionné de 1µg par ml de nicotinamide, saccharosé à 20 pour cent et contient 5.000µg par ml d'acide benzylpénicilloïque. Le substrat est obtenu par action de 50.000 unités de bactopénase sur 10.000 unités par ml de benzylpénicilline pendant deux heures à la température ambiante. Après ce délai, un dosage iodométrique avant et après hydrolyse alcaline selon la méthode de GOODALL (87) a permis de vérifier la disparition totale de la pénicilline.

Après 48 heures d'incubation à 37°C presque tout l'acide pénicilloïque est transformé en pénicillamine. Les germes sont alors éliminés par centrifugation à 8.000 tours/minute pendant 30 minutes. Le surnageant est passé sur des résines échangeuses d'anions. Le saccharose est éliminé par rinçage prolongé à l'eau distillée bouillie. L'absence de réaction de Fehling après hydrolyse acide des eaux de lavage, permet d'apprécier la disparition complète du saccharose.

La pénicillamine est éluée dans le front d'une solution d'HCl N. La solution éluée contient 1.150µg par ml de pénicillamine dosée après neutralisation à la NaOH N par les méthodes de PAL et de FALS-VEATLE. La pureté du produit est vérifiée par chromatographie sur papier. La solution ainsi obtenue doit être utilisée immédiatement.

II. RESULTATS.

Des pénicillamines d'origine différente ont été utilisées : la pénicillamine commerciale et les pénicillamines obtenues par hydrolyse chimique ou par hydrolyse enzymatique de la pénicilline.

A. PENICILLAMINE COMMERCIALE PURIFIEE .

J. LATRILLE avait fait ses premiers essais avec trois lots de pénicillamine de la N.B.C. : D pénicillamine lot 5.334, L. pénicillamine lot 8.094, DL pénicillamine lot 5411. Ces lots ayant probablement perdu leur activité par vieillissement, nous avons utilisé d'autres lots N.B.C. : D pénicillamine lot2.999, D pénicillamine HCl 5.400 et 7.675. Or, ils étaient aussi totalement inactifs. Par contre, avec la D pénicillamine Aldrich, lot O 32.561, nous avons pu reproduire les résultats initiaux.

Le milieu B.P.G., les souches et les inoculums étant identiques dans chaque expérimentation, le saccharose stérilisé uniquement sur filtre Seitz, les causes d'insuccès ne pouvaient être que de deux sortes : l'eau ou la pénicillamine elle-même.

a) L'eau.

La pénicillamine étant un chélateur énergique de certains cations et métaux lourds, ses fonctions réactives pourraient être masquées par des métaux comme le cuivre, présent dans l'eau distillée utilisée car elle est obtenue dans un appareil en cuivre.

Or, la mesure de la résistivité de l'eau était de 500.000 ohms et la recherche du cuivre n'a déterminé aucune trace décelable. D'autre part, divers essais ont été réalisés en utilisant de l'eau désionisée et de l'eau bidistillée dans un appareil en verre. Les résultats étaient toujours aussi inconstants.

Le Ca^{++} et le Mg^{++} pouvaient être chélatés par la pénicillamine. Les dosages de Ca^{++} ont été effectués au Technicon, ceux du Mg^{++} par la méthode de MANN et YOE (139) sur des échantillons d'eau et de B.P.G. Les quantités dosées respectivement ne peuvent interférer comme nous le montrerons ultérieurement.

Donc l'eau ne paraissait pas être la cause de notre insuccès. Les échantillons de pénicillamine ont alors été étudiés.

b) La pénicillamine.

1°. Les différents lots ont été soumis à la chromatographie sur papier selon le protocole opératoire décrit précédemment, c'est-à-dire butanol/acide acétique/eau, dans le rapport 125/30/125. Tous les chromatogrammes ont été révélés à la ninhydrine.

Tous les échantillons présentent le spot caractéristique de la pénicillamine qui est une tache irrégulière et légèrement échancrée à la base de rf = 0,11 . Tous les échantillons sauf celui de chez ALDRICH lot O 32.561 présentent une traînée importante qui surmonte le spot, ninhydrine positive, qui se termine par un deuxième spot de faible intensité mais de rf = 0,56.

Pour vérifier que le solvant n'était pas la cause de ce type de migration, différents mélanges ont été utilisés.

- le mélange butanol/eau/acide acétique, dans le rapport 120/30/50 donne un spot de pénicillamine de rf = 0,28, spot surmonté à nouveau d'une traînée et dont le sommet a un rf = 0,58.
- le mélange butanol/eau/acide acétique dans le rapport 14/26/5 donne un spot de rf = 0,21 qui présente la même image de migration.
- le mélange pyridine/eau/butanol dans le rapport 6/6/6 donne une image de migration identique aux précédentes. Le rf de la pénicillamine est de 0,37.

Seule la pénicillamine Aldrich lot O 32 561 présente, quel que soit le solvant utilisé, un spot bien délimité et unique de pénicillamine. Comme c'est la seule pénicillamine active, nous pensons que le deuxième spot de migration corespond à une impureté.

2°. Par chromatographie sur papier, nous avons tenté d'identifier le produit de dégradation de la pénicillamine responsable du deuxième spot qui peut être de deux sortes : soit un chelate de pénicillamine avec un métal, soit un produit d'oxydation ou de polymérisation.

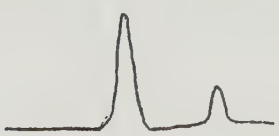
a - Nous avons préparé avec des cations di et trivalents des chélates de pénicillamine. Le chromatogramme (cliché 1) montre que

les chélates de Zn, de Pb,de Cd migrent avec un rf voisin de 0,56 et de 0,11. Le chélate de Cu n'est pas révélable à la ninhydrine. Les chélates avec les métaux lourds type Se et Te ont des rf très différents. Les trois derniers cations ne peuvent donc pas être les impuretés présentes dans les produits commerciaux. Les autres cations, après minéralisation des pénicillamines commerciales n'ont pas été détectés par les méthodes chimiques. Ce ne sont pas davantage des traces de Ca^{++}, de Ni^{++}, de Fe^{++} ou de Fe^{+++} qui sont responsables du deuxième spot car ils sont faciles à mettre en évidence chimiquement, donnant un complexe coloré en pourpre avec la fonction thiol de la pénicillamine en présence d'NH_3. Donc apparemment ce n'est pas un chelate de pénicillamine qui est l'impureté présente dans certains lots de produits commerciaux.

b - Le spot pourrait être un disulfure de pénicillamine, premier stade d'oxydation de la pénicillamine. Sa synthèse a été réalisée en condensant deux molécules de pénicillamine en présence d'HN_3 (45). Après purification du produit par cristallisation dans du méthanol, le disulfure de pénicillamine migre avec un rf proche de la pénicillamine =0,18.

Il ne peut être responsable en aucun cas, ni de la traînée, ni du spot supérieur parasite. Pourtant cette impureté est présente et peut être extraite de la manière suivante.

c - Les pénicillamines commerciales ont été purifiées par chromatographie sur résines échangeuses d'anions. Une solution aqueuse de 1.000 µg par ml de pénicillamine de la N.B.C. lot n° 5.334 a été fixée sur Amberlite. Deux fractions différentes ont été éluées dans le front d'HCl N (figure 24). En opérant avec des solutions d'HCl 0,1 N, deux pics différents ont été séparés.



Enregistrement aux U.V. des deux fractions de pénicillamine éluée.

- La première fraction donne un spot homogène de rf = 0,11 à la chromatographie sur papier, une réaction de PAL positive et stable : elle correspond à la pénicillamine. Elle est biologiquement active.
- La deuxième fraction essayée de la même façon que la précédente et aux mêmes concentrations (dosage à la ninhydrine) ne modifie en rien l'aspect normal des germes. Cette fraction donne une réaction de PAL fugace, elle doit donc contenir des fonctions-SH moins accessibles aux réactifs.

MISE EN EVIDENCE DES IMPURETES DE LA PENICILLAMINE

PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

*

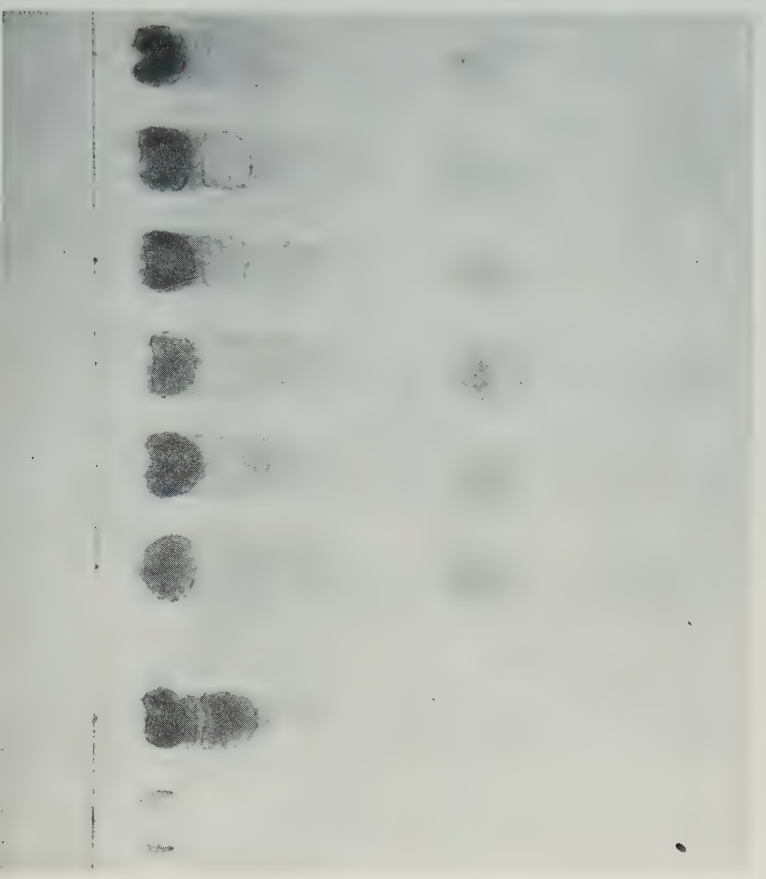
* *

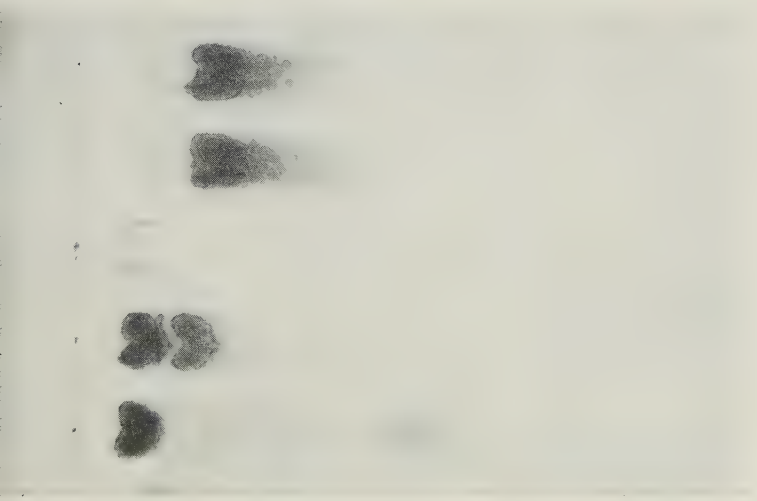
CLICHE 1 - Différentes images de migration peuvent être obtenues lorsque la pénicillamine N.B.C. est mise en contact une heure à 37°C avec un cation di ou trivalent.

Dans la première photo, la première image représente le témoin pénicillamine N.B.C. Noter les deux spots, l'un de rf : 0,11, l'autre d'intensité moindre de rf = 0,56. Puis de gauche à droite, on observe successivement les images de migration de la même pénicillamine qui a chélaté soit du

Cl_2Co
SO_4Co
SO_4Zn
Cl_2Pb
SO_4Cd
Se
SO_4Cu
Cl_2Hg (2 fois)
SO_4Cu
Te

et enfin un autre témoin pénicillamine.





Il est cependant important de souligner que l'élimination de la fraction 2 rend à la pénicillamine commerciale son activité biologique.

d - 1.000 µg par ml de pénicillamine Aldrich en solution aqueuse ont été fixés sur Amberlite et élués par HCl N. L'enregistrement aux U.V. montre un pic unique et très net. Cette pénicillamine est donc très pure, ce qui paraît être un caractère indispensable pour qu'elle soit biologiquement active

En résumé, la purification des pénicillamines commerciales inactives, conduit à isoler deux fractions, l'une induisant des formes bactériennes anormales et l'autre tout à fait inactive. L'élimination de cette deuxième fraction fait récupérer à la pénicillamine ses propriétés biologiques qui sont supérieures à celles des pénicillamines commerciales actives, non purifiées. La deuxième fraction n'a pu être identifiée exactement. Elle pourrait être un produit de polymérisation de la pénicillamine.

B.PENICILLAMINE EXTRAITE DES HYDROLYSATS ACIDES DE 6 APA.

L'hydrolyse chlorhydrique à pH = 2, une heure à 100°C dégrade toute les pénicillines en pénicillamine, mais le pourcentage de pénicillamine obtenu par rapport à la quantité en poids de pénicilline mise en solution est différent selon la nature de la pénicilline.

Voici les résultats obtenus :

Synthécilline	: 9,5	pour cent de pénicillamine
Oxacilline	: 9,5	" " " "
Pénicilline G	:10	" " " "
Méthicilline	:11	" " " "
Pénicilline V	:14	" " " "
Ampicilline	:34	" " " "
6 APA	:38	" " " "

Les deux pénicillines qui ont le meilleur rendement sont l'ampicilline et le 6 APA.

Les hydrolysats acides d'ampicilline n'ont pas été utilisés car une légère activité entibiotique persiste.

Une pénicillamine très pure est obtenue après passage sur Amberlite ou Florisil des hydrolysats chlorhydriques de 6 APA donnant un spot unique à la chromatographie sur papier de rf = 0,11 et une réaction de PAL fortement positive. Nous n'avons jamais mis en évidence de taches correspondant à des restes de 6 APA (rf = 0,47) ou à de l'acide 6-amino pénicilloïque (rf = 0,30). D'ailleurs une solution de 2.500 µg par ml de 6 APA traitée par HCl n'est pas inhibitrice pour le staphylocoque 209 P dont la sensibilité est de 12,5 µg par ml. Cette pénicillamine d'extraction est stable en milieu acide, mais se dégrade facilement en milieu neutre ou alcalin. Elle doit donc être utilisée immédiatement après neutralisation de la solution chlorhydrique.

C'est avec des solutions de pénicillamine préparées ainsi chaque jour que nous avons étudié les caractères des formes bactériennes anormales produites par la pénicillamine.

C. PENICILLAMINE OBTENUE PAR HYDROLYSE BACTERIENNE DE L'ACIDE BENZYL-PENICILLOIQUE.

Par cette méthode, nous n'avons jamais pu obtenir de solutions de pénicillamine ayant des concentrations supérieures à 1.150 µg par ml, le milieu synthétique de Monod n'étant pas un milieu très favorable pour une bonne production.

Cette pénicillamine est plus active sur les germes que celles obtenues précédemment : des quantités beaucoup plus faibles induisent des formes anormales. D'autre part, elle a une action lytique assez importante lorsqu'elle est utilisée aux concentrations voisines de 200 µg par ml.

Cette action pourrait être due à l'activité lytique de la Pénicilline G restante, le substrat étant obtenu par hydrolyse enzymatique de cette pénicilline. Rappelons que la méthode de dosage iodométrique a un seuil de sensibilité de 10 µ g par ml, donc des traces de benzylpénicilline pourraient exister.

Dans le but d'éliminer cette possibilité, 3 expériences ont été faites, chacune portant sur une série de tubes recevant des dilutions géométriques de pénicillamine.

La première galerie sert de témoin. Les tubes de la deuxième sont additionnés de Bactopénase destinée à détruire toutes traces de Pénicilline G susceptibles de s'y trouver. Tous les tubes de la troisième ont été traités à l'acétate d'isoamyle à pH = 2, pour extraire toute trace possible de pénicilline. Chacun des tubes des trois galeries reçoit un inoculum de *Staphylococcus aureus* 209 P de 300.000 germes par ml. On constate qu'après 24 heures d'incubation à 37°C, dans chacune des galeries, il y a inhibition de la croissance bactérienne dans les deux premiers tubes. Ceci signifie que 300 à 600 µ g par ml de pénicillamine purifiée sont capables d'inhiber la croissance du staphylocoque. En effet, la Pénicilline G ne peut être responsable de l'inhibition puisque si elle est présente dans la première galerie, elle a été éliminée dans les deux autres par deux procédés différents, l'un enzymatique, l'autre chimique.

La pénicillamine d'origine enzymatique a donc une action sur la morphologie et sur la vitalité de certaines souches.

En conclusion, il apparaît que selon le mode de production, chimique ou enzymatique, la pénicillamine produite ne possède ni une activité biologique, ni un rendement de production comparables. En effet, la pénicillamine d'origine enzymatique est beaucoup plus active que celle d'origine chimique et possède même, pour certaines concentrations, une activité antibiotique sur le *Staphylococcus aureus 209 P.* D'autre

part, l'hydrolyse chimique du 6 APA permet d'ontenir 38 pour cent de pénicillamine, tandis que, comme nous l'avons vu précédemment, l'hydrolyse enzymatique n'en produit pratiquement pas. Inversement, la benzylpénicilline est un substrat très favorable pour la production de pénicillamine par voie enzymatique, tandis qu'à partir de ce substrat, l'hydrolyse chimique n'en produit que 10 pour cent. Donc, les mécanismes de dégradation par ces deux modes d'hydrolyse doivent être différents.

- ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES BACTERIES -

I. MATERIEL ET METHODES.

A. ETUDE DE L'ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES GERMES.

Les solutions de chaque pénicillamine neutralisées et stérilisées par filtration sur membrane millipore (GSWP 0,4 µ) sont réparties en milieu B.P.G. saccharosé à 20 pour cent de façon à réaliser des concentrations de 10.à 1.000 µg par ml. L'inoculum est de 300.000 germes par ml. Toutes les entérobactéries et les Pseudomonas étudiés précédemment ont été testés. Après 12 à 18 heures d'étuve à 37°C, le contenu de chaque tube est examiné en contraste de phase et comparé à un témoin sans pénicillamine.

L'absence d'activité antibiotique des pénicillamines a été vérifiée par la méthode des dilutions sériées en milieu B.P.G. sans saccharose sur le staphylocoque 209 P ou sur boîte en utilisant Sarcina lutea ATCC 9341.

B. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES GERMES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

L'examen microscopique est fait sans coloration, directement au Zetopan équipé du dispositif anoptral qui peut donner un contraste positif et négatif et au contraste de phase positif de Zeiss.

Pour être étudiées les formes anormales induites par la pénicillamine doivent être "stabilisées" et fixées.

1°. Les sphéroplastes pénicillamine étant très fragiles sont "préfixés" en ajoutant directement au milieu de culture de la glutaraldéhyde en tampon phosphate 0,4 M de manière à obtenir une concentration finale de 6,5 pour cent. Après 3 heures de contact, on concentre les formes anormales en centrifugeant les germes 5 minutes à 4.000 tours/minute .

2°. Pour stabiliser les sphéroplastes 6 APA., J. LATRILLE disposait une goutte du culot de centrifugation sur une mince pellicule de

gélose étalée à la surface de la lame porte-objet. Ce procédé n'est pas applicable dans le cas présent car les sphéroplastes pénicillamine sont très sensibles, même préfixés, aux variations de tonicité. Aussi les germes ont été incorporés dans un polymérat d'alginate de Ca^{++} (12) hypertonique. Une goutte du culot de centrifugation des germes est déposée sur une lame porte-objet dans une goutte d'acide alginique à 1 pour cent et une goutte de saccharose à 40 pour cent. Une goutte de Cl_2 Ca est placée sur la lamelle, puis sera vivement mise au contact du mélange précédent par retournement et rotation de la lamelle. En présence de Ca^{++} l'acide alginique se gélifie très rapidement . Les germes sont alors immobilisés dans le gel qui ne gêne par l'observation. Les sphéroplastes plus volumineux que les germes normaux sédimentent, ce qui réalise une véritable concentration de ces formes anormales dans le plan inférieur du polymérat, facilitant leur examen.

C. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES GERMES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Notre étude a porté essentiellement sur *Escherichia coli* O_{111} B_4 et *Escherichia coli* K_{12} C_{600}, qui sont les souches les plus sensibles à l'induction par la pénicillamine. Les sphéroplastes ont été induits selon les conditions opératoires précédemment décrites. Ils ont été fixés et inclus dans le Vestopal selon la technique classique de KELLENBERGER et RYTER (120).

Le matériel à inclure étant extrêmement fragile, quelques modifications ont été successivement introduites.

1°. Après centrifugation 5 mn à 3.000 tours/minute le culot a été repris soit dans un gel d'alginate de calcium soit dans un caillot plasmatique.

La première méthode a donné de bons résultats, mais il faut modifier la composition du tampon car les ions phosphate précipitent en présence de calcium et les colorations au plomb révèlent un réseau salissant le fond de la préparation. La deuxième méthode est très simple. Elle consiste à reprendre le culot de centrifugation dans 0,1 ml de Cl_2 Ca M/40, 0,1 ml de plasma normal Mérieux et 0,1 ml de venin de vipère Russel. Au sein du caillot plasmatique les fibres de fibrine enserrent les germes dans un réseau compact et les protègent de la lyse. Le caillot ou le gel sont ensuite découpés en petits cubes, colorés à l'acétate d'uranyle et inclus dans le Vestopal selon la méthode classique. Ces méthodes ont été utilisées puis abandonnées en faveur de la suivante.

2°. Les germes ont été préfixés à la glutaraldéhyde directement dans le milieu de culture selon la méthode indiquée page puis centrifugés et inclus soit dans le Vestopal, soit dans l'Epon.

II. RESULTATS.

La pénicillamine est responsable de trois types d'effets en fonction de son origine et des concentrations utilisées. Elle peut être

inhibitrice, elle peut induire des formes anormales, ou être sans aucun effet.

A. ACTION INHIBITRICE DES PENICILLAMINES.

1 - La pénicillamine d'origine enzymatique.

Il a été noté précédemment que 300 µ g par ml de pénicillamine d'origine enzymatique c'est-à-dire endogène inhibent la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* 209 P. En milieu B.P.G. hypertonique 200 µg par ml de cette pénicillamine sont capables d'inhiber totalement la croissance d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 . Dans les milieux contenant des concentrations de 100 et 150 µg par ml, on observe à l'examen microscopique en contraste de phase, la présence de nombreuses formes globuleuses très altérées, souvent éclatées et vidées de leur cytoplasme. Ce sont de véritables ghosts qui signent l'activité lytique de la pénicillamine d'origine enzymatique.

2 - La pénicillamine d'hydrolysat acide de 6 APA.

En microscopie photonique il semble que 100 µg par ml de pénicillamine d'origine chimique diminuent la densité microbienne des entérobactéries traitées. A titre d'illustration de l'observation nous présentons les photographies prises après 18 heures d'incubation de Klebsiella n°5 (clichés 3 et 4) et de Salmonella Ty_2 (clichés 5 et 6). Ce phénomène est peu prononcé et difficile à chiffrer par mesure de la densité optique au spectrophotomètre Unicam SP 500.

3 - La pénicillamine d'origine commerciale.

La pénicillamine d'origine commerciale, au même titre que les deux autres, peut être inhibitrice pour une souche d'entérobactéries. Il s'agit d'*Escherichia coli* K_{12} C_{600} .

En milieu synthétique de BEGGS et ROGERS dont la formule est donnée page 138, *Escherichia coli* K_{12} C_{600} est capable de se développer en présence de glycérol si le milieu est additionné de 2µ g par ml de nicotinamide et de leucine, la souche étant leucine (-). Si 100µ g par ml de pénicillamine commerciale sont ajoutés au milieu, *Escherichia coli* K_{12} ne se développe que très difficilement.

Une question vient à l'esprit. Est-ce que la pénicillamine se comporterait comme l'analogue structural de la leucine ?

Le phénomène est partiellement reproductible en milieu B.P.G. Au biophotomètre enregistreur, nous avons observé la croissance d'*Escherichia coli* K_{12} en présence de 50 et de 100 µg par ml de pénicillamine. En milieu normotonique, avec un inoculum de 300.000 germes par ml, le nombre de générations normal est de 3,16 en 2 h.En présence de 50 µg par ml. il est de 2,96. En présence de 100 µg par ml, il est de 2,22. Si le temps moyen de génération est calculé, nous trouvons que celui du témoin est de

42 mn, en présence de 50 µ g par ml il est de 45 mn, et de 100 µg par ml il est de 54 mn. La pénicillamine ralentit donc la croissance bactérienne d'*Escherichia coli* K_{12} C_{600} . En milieu hypertonique l'effet de la pénicillamine est moins accentué.

Il est important de signaler que la pénicillamine commerciale n'est capable que de modifier la croissance de la souche d'*Escherichia coli* K_{12} C_{600} .

B. INDUCTION DE FORMES BACTERIENNES ANORMALES PAR LA PENICILLAMINE.

L'examen microscopieue en contraste de phase montre que la pénicillamine induit des formes bactériennes anormales uniquement en milieu hypertonique à des concentrations allant de 500 à 50 µ g par ml. Ces formes varient selon la concentration de la pénicillamine et le germe étudié.

La solution de pénicillamine commerciale purifiée est active pour des concentrations comprises entre 500 et 150 µ g par ml, celle extraite du 6 APA entre 250 et 100 µg par ml, celle d'hydrolyse enzymatique entre 200 et 25 µg par ml. Mais les trois pénicillamines induisent des formes bactériennes comparables.

1 - La pénicillamine d'origine chimique.

Elle a été préférentiellement étudiée, car c'est la plus facile à obtenir pure. La pénicillamine touche toujours la population d'une manière hétérogène. Dans une culture on observe de nombreux germes normaux ainsi que tous les intermédiaires entre le germe gonflé, trapu, ramassé sur lui-même, de taille comprise entre 1 et 2µ et le gros sphéroplaste de 5 µ de diamètre. Il semble qu'il faudrait mieux parler d'induction de formes anormales par la pénicillamine que d'induction sphéroplastique . Les colibacilles O_{111} B_4 et K_{12} étant les plus sensibles à cet agent inducteur seront le matériel de choix pour cette étude.

a - Escherichia coli O_{111} B_4 *et* K_{12}.

La pénicillamine, même utilisée à de très faibles concentrations, est capable de provoquer l'immobilisation de la plupart des colibacilles. Cet effet semble avoir pour conséquence la formation d'amas, on a presque envie de dire d'agglutinats de germes qui peuvent être plus ou moins volumineux. C'est ce que montre le cliché 7. Ces amas sont constitués de germes de taille et de forme plus ou moins disparates selon les concentrations de pénicillamine introduites.

α - *formes anormales induites*

En présence de cent µ g par ml de pénicillamine, on observe la présence de véritables sphéroplastes plus ou moins gros, plus ou moins sphériques dont la taille maximum est de 5 µ de diamètre. Ils sont souvent

déformés par une ou plusieurs vacuoles de taille variable. A côté de ces sphéroplastes, on observe des germes en forme de massues, en battant de cloche, quelquefois une vacuole centrale est si volumineuse qu'elle déforme le germe en lui conférant un aspect de citron aux deux extrémités très effilées. Quelquefois, au contraire, il y a augmentation de volume des deux extrémités des germes, donnant une image en diabolo. Les germes sont parfois tellement allongés et arqués qu'ils peuvent prendre l'allure d'une banane (cliché 10). Très rarement de véritables oreilles de lapin on été observées.

A côté de ces formes d'allure curieuse, de taille oscillant entre 2 et 3 µ, la pénicillamine induit des formes filamenteuses, plus ou moins étirées pouvant parfois atteindre 10 et même 15 µ de longueur comme le montre le cliché 11. Ces formes sont quelquefois renflées et déformées par une vacuole et la répartition du matériel y est souvent très hétérogène. A côté de ces formes monstrueuses, on peut noter la présence de véritables "chaînettes" constituées de 3, 4, 5 ou 6 éléments, jamais plus. Les germes sont alors trapus, souvent renflés, jamais vascuolisés (cliché 9). Ces images permettent peut-être d'évoquer un blocage de la division des germes dans sa phase ultime.

La pénicillamine transforme donc la population de colibacilles d'une manière très hétérogène. Un fait curieux nous a souvent intriguée. En fonction de la concentration de pénicillamine, on peut favoriser l'apparition de telles ou telles formes ou détriment des autres. Il a été noté précédemment que le sphéroplaste pénicillamine n'est induit que par des concentrations de pénicillamine comprises entre 100 et 200 µ g par ml lorsqu 'elle est d'origine chimique. En deçà et au delà de ces concentrations, le sphéroplaste disparaît. En deçà on observe une prédominance de formes filamenteuses et des "chaînettes" de bacilles. Au delà, le nombre de formes vides membranaires appelées ghosts augmente ainsi que le germe normal et mobile ; les formes anormales intermédiaires ont disparu. Ainsi ces divers aspects de colibacilles correspondent, peut-être, à un stade différent de l'action de la pénicillamine, ou a une sensibilité différente des germss à la pénicillamine selon la phase de leur croissance.

Un second fait nous paraît intéressant à signaler. La morphologie d'*Escherichia coli normaflore* n'est pas altérée par la pénicillamine. Aucun sphéroplaste n'est induit, seules quelques formes filamenteuses sont observables.

- Le sphéroplaste pénicillamine.

Il faut noter que les petits sphéroplastes de 2 à 3 µ de diamètre ne sont jamais sphériques. Ils ont toujours des formes irrégulières, la paroi bactérienne semblant conserver sa rigidité par endroits. Le contour du sphéroplaste est vaguement polyédrique. Le matériel cellulaire semble réparti d'une manière hétérogène avec de fortes zones de condensation. Les parties claires sont probablement dues à la présence de vacuoles.

Les sphéroplastes plus gros, de 4 à 5 µ , s'opposent aux précédents par leur contour qui a tendance à s'arrondir. Le matériel cellulaire est réparti plus irrégulièrement que précédemment, il est souvent repoussé dans un pôle de la bactérie par des masses probablement vacuolaires, souvent très volumineuses (cliché 8).

Il semble que l'on assiste à diverses étapes de l'action de la pénicillamine. La forme petite, dense à répétition cytoplasmique assez homogène où des petites plages claires apparaissent dans la masse cytoplasmique serait le premier signe évident de l'altération de la bactérie par la pénicillamine. Puis l'action de l'agent inducteur s'intensifierait, provoquant la formation de formes monstrueuses, dont la paroi semble avoir perdu sa rigidité, et qui seraient par voie de conséquence plus fragiles. Ces formes auraient alors tendance à éclater comme peuvent en témoigner les nombreux ghosts présents dans les préparations.

Une question vient alors à l'esprit. Ces formes n'ont été observées qu'en milieu B.P.G. hypertonique. Ne seraient-elles pas dues à un phénomène de plasmolyse indépendant ou facilité par l'action de la pénicillamine ? Pour écarter cette hypothèse, nous avons induit des sphéroplastes par 100 µ g par ml de pénicillamine en milieu B.P.G. contenant 5 à 20 % de saccharose. Nous avons noté qu'en milieu faiblement hypertonique contenant 5, 8 ou 12 % de saccharose, la pénicillamine est capable d'induire des spéroplastes presque aussi gros et aussi vacuolisés qu'en présence de 20 % de saccharose comme en témoignent les clichés 12,13;leur nombre est seulement inférieur. Il apparaît donc que la tonicité ne joue un rôle très important que dans la conservation de la structure du sphéroplaste.

b - Les salmonelles.

Salmonella Ty_2 est très sensible à l'action de la pénicillamine et comme le montre le cliché 5, 100 µg par ml de pénicillamine induisent des sphéroplastes volumineux, paraissant fortement vacuolisés. A côté de ces formes sphériques on observe la présence de très nombreux ghosts.

c - Les Citrobacter et Klebsielles.

Comme l'indique le cliché 3, la Klebsielle est peu sensible à l'action de la pénicillamine. Celle-ci favorise l'apparition de formes plus volumineuses que la normale, très trapues, parfois allongées, mais le véritable sphéroplaste n'est jamais observé. La capsule protège peut être le germe. Le citrobacter réagit comme les *Klebsielles*.

d - Le pseudomonas n°100.

La pénicillamine modifie fortement la morphologie du pyocyanique. La mobilité est totalement inhibée, de nombreux éléments de la population sont altérés même s'il n'y a jamais induction de grosses formes,

sphéroplastiques. On observe de très nombreuses formes petites, trapues gonflées, dépassant rarement 2 µ du diamètre. Le matériel cellulaire semble réparti d'une manière homogène dans le sphéroplaste et ne semble pas fragmenté par des vacuoles (cliché 6).

De toutes façons, quelle que soit la souche étudiée, les sphéroplastes pénicillamine ont des caractères particuliers. Ils sont très sensibles au choc osmotique. Ils ne résistent pas à la filtration ni à la centrifugation si elle est supérieure à 4.000 tours/mn. Ils se conservent peu de temps dans le milieu inducteur. Ils apparaissent vers la 12ème heure d'incubation et à la 18ème heure ils sont plus nombreux qu'à la 24ème heure. Il est vraisemblable, vu le nombre de débris membranaires observés dans les préparations à la 24ème heure, qu'il y a lyse de ces formes fragiles et non réversion spontanée vers la bactérie d'origine.

En conclusion, il apparaît que la pénicillamine modifie la rigidité de la paroi de toutes les entérobactéries et du pyocyanique étudiés, ce qui provoque l'induction de formes sphéroplastiques plus ou moins monstrueuses et fragiles dont la perméabilité doit être modifiée.

Par la méthode des coupes ultra fines, l'étude en microscopie électronique a permis de vérifier cette hypothèse et d'étudier les modifications de structures bactériennes provoquées par la pénicillamine. Seuls quelques effets seront notés, une étude fine des structures des germes traités dépasserait le cadre de ce travail. Elle sera envisagée dans une prochaine publication.

L'action de la pénicillamine sur la structure bactérienne se résume à un décollement net de la paroi et à une prolifération de la membrane cytoplasmique. Parfois, il y a rupture de la paroi libérant des protoplastes authentiques. La paroi donne alors de curieux aspects myéliniques. Le terme ultime de la lyse bactérienne est la formation de ghosts formés de débris membranaires. C'est ce que montrent les clichés suivants (clichés 16 - 17 - 18 - 19 - 20 - 21).

2 - La pénicillamine d'origine enzymatique.

Il est vrai que la pénicillamine d'origine enzymatique est beaucoup plus active que les autres pénicillamines car des concentrations aussi faibles que 12 µg par ml sont capables d'induire des formes anormales et même quelques sphéroplastes.

D'autre part, dès les concentrations de 50 et 75 µg par ml, on observe de nombreux ghosts dans les préparations.

3 - La pénicillamine commerciale.

C'est la pénicillamine la moins active. De plus, sous forme cristallisée, elle est soumise dans le temps à une certaine altération, probablement due à une oxydation ou à une polymérisation. Lorsqu'elle est fraîchement purifiée elle n'est capable d'induire des sphéroplastes

pénicillamine qu'à des concentrations voisines de 250 à 300 µg par ml. A des concentrations inférieures elle n'induit pas des formes globuleuses et trapues. A des concentrations supérieures, à 500 µg par ml, contrairement aux autres pénicillamines, celle -ci modifie très peu ou pas du tout la morphologie des germes, Nous retrouvons ici un phénomène de zone.

En conclusion, il apparaît nettement que le comportement de la pénicillamine sur les germes est très variable selon la nature de la pénicillamine et sa concentration puisqu'elle peut être soit inhibitrice, soit sans aucun effet. Le plus souvent, elle altère la morphologie des germes en les transformant en germes trapus et déformés ou en véritables sphéroplastes.

III. CONCLUSIONS.

Ainsi toutes les pénicillamines purifiées, quelle que soit leur origine, sont capables d'induire l'apparition de formes bactériennes anormales, la pénicillamine d'origine enzymatique étant la plus active. Des témoins ont été faits systématiquement pour éliminer les formes sphéroplastiques spontanées décrites par WEINBERG (257). Il a été important de montrer que l'activité de la pénicillamine ne se manifeste que lorsque nous utilisons des solutions chlorhydriques très pures et fraîchement préparées.

La pénicillamine n'apparaît pas alors comme une molécule inerte car elle est capable de modifier très fortement la morphologie bactérienne, son action ne se manifestant pas cependant sur tous les individus d'une population. La plupart des germes subissent quelques altérations de leur structure membranaire et acquièrent des contours irréguliers en demeurant viables. Quelques germes sont plus altérés et sont transformés en sphéroplastes. Toute la paroi bactérienne peut être décollée et semble perdre sa rigidité. La membrane cytoplasmique limite alors le matériel cytoplasmique qui semble , au fur et à mesure que le sphéroplaste grossit, perdre son contenu, Les formes sphéroplastiques les plus volumineuses semblent irréversibles et détruites par lyse, ce qui nécessite la rupture, qui peut être indépendante, et de la partie de la paroi décollée, et de la membrane cytoplasmique.

---°---

ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

ACTION DE LA D PENICILLAMINE (100 µg par ml)

SUR QUELQUES ENTEROBACTERIES

APRES 18 HEURES DE CULTURE EN MILIEU B.P.G. HYPERTONIQUE

*

* *

CLICHE 2 - *Klebsiella* n° 5, culture témoin.

CLICHE 3 - *Klebsiella* n° 5 traitée. Observer les formes globuleuses et allongées et les germes normaux.

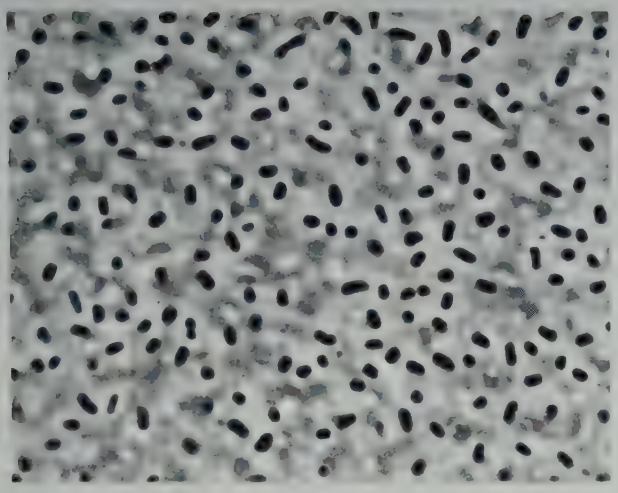
CLICHE 4 - *Salmonella* Ty_2, culture témoin.

CLICHE 5 - *Salmonella* Ty_2 traitée. Noter la pauvreté microbienne de la culture, la grosseur du sphéroplaste et la présence de germes lysés.

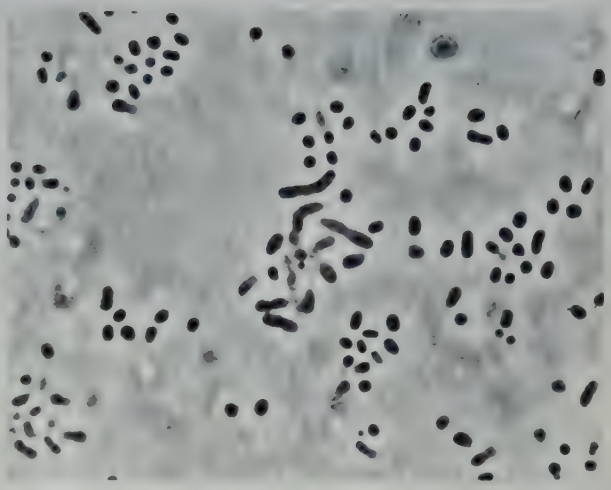
CLICHE 6 - *Pseudomonas* n° 100 traité. Observer les formes globuleuses et trapues et les germes normaux.

CLICHE 7 - *Escherichia coli* $O_{111}B_4$. Noter l'importance del'amas formé de germes normaux, de sphéroplastes, de formes globuleuses et filamenteuses.

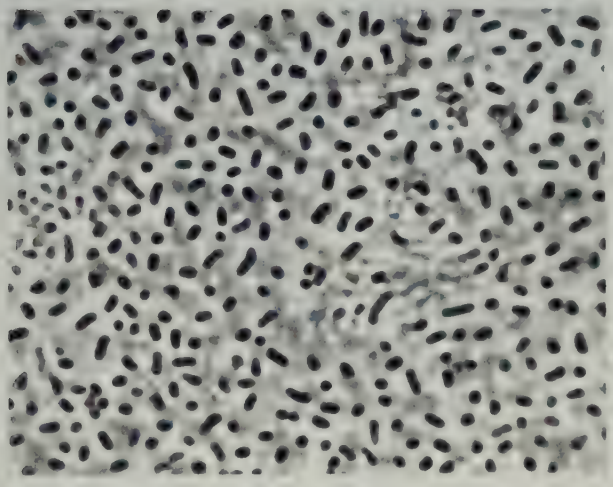
Contraste de phase G x 625. Agr. photo X 4.



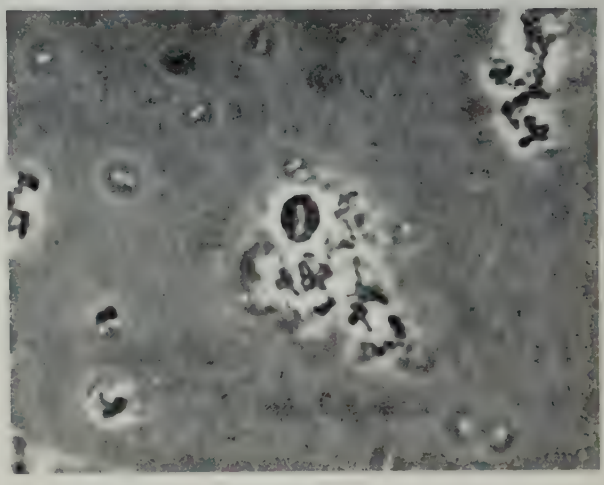
2



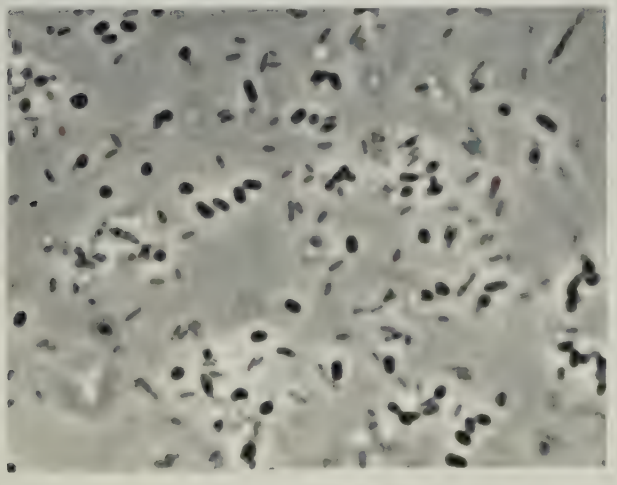
3



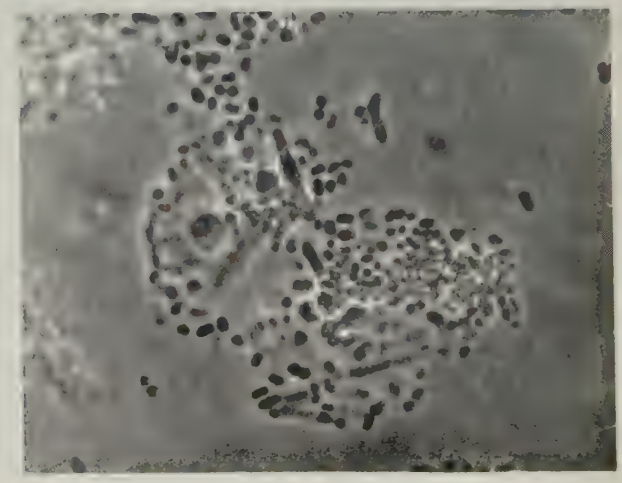
4



5



6



7

ACTION DE LA D PENICILLAMINE (100 µg par ml)

SUR *E. coli* O_{111} B_4

APRES 18 HEURES DE POUSSE EN MILIEU B.P.G. HYPERTONIQUE

*

* *

- MILIEU B.P.G. + 20 % DE SACCHAROSE.

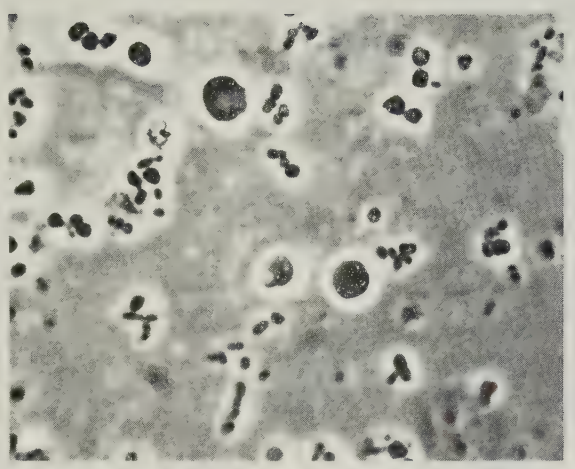
CLICHES 8 - 9 - 14 - 15 - Noter la grosseur et la forme des sphéroplastes pénicillamine, la répartition irrégulière du matériel cellulaire provoquant l'apparition de zones claires, les formes anormales de taille variable et les germes normaux.

CLICHES 10 - 11 - Germes allongés, formes filamenteuses ou en banane.

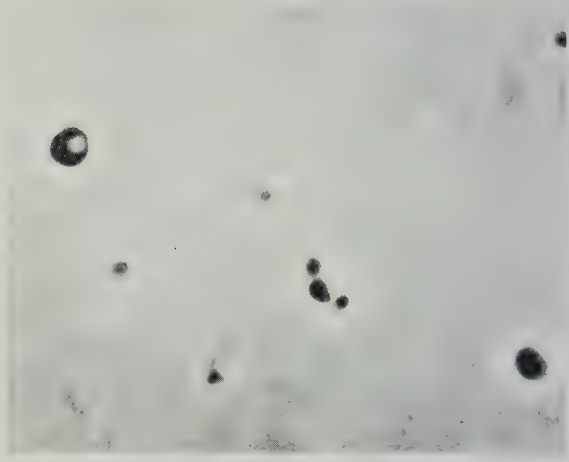
- MILIEU B.P.G. + 5 % DE SACCHAROSE

CLICHES 12 - 13 - Les formes sphéroplastiques observées sont comparables quelle que soit la tonicité du milieu.

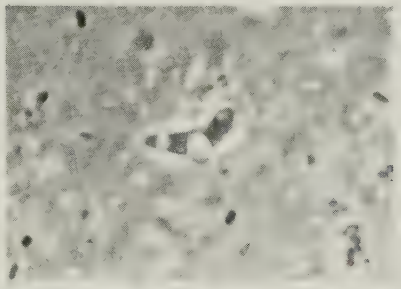
Contraste de phase, G x 625. Agr. photo X 4.



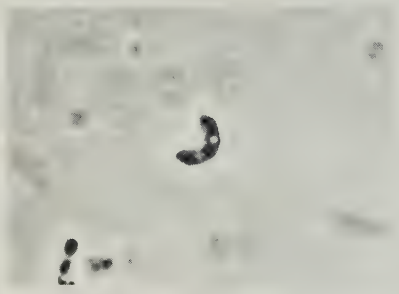
8



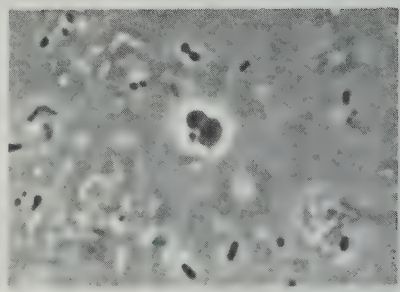
9



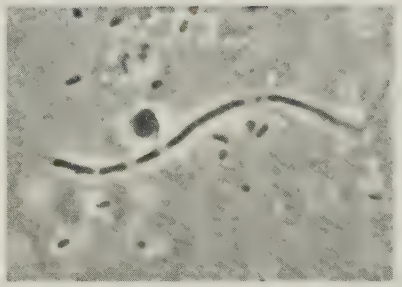
10



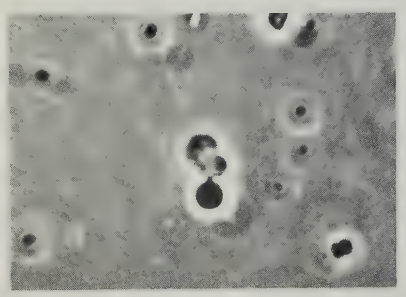
12



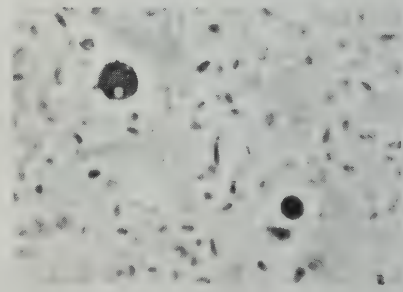
14



11



13



15

ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

*
* *

CLICHE 16 - Germe de dimension normale.
Noter le décollement de la paroi et de la membrane cytoplasmique aux deux extrémités. Cet aspect n'est qu'une exagération de ce que l'on peut observer chez le germe normal.

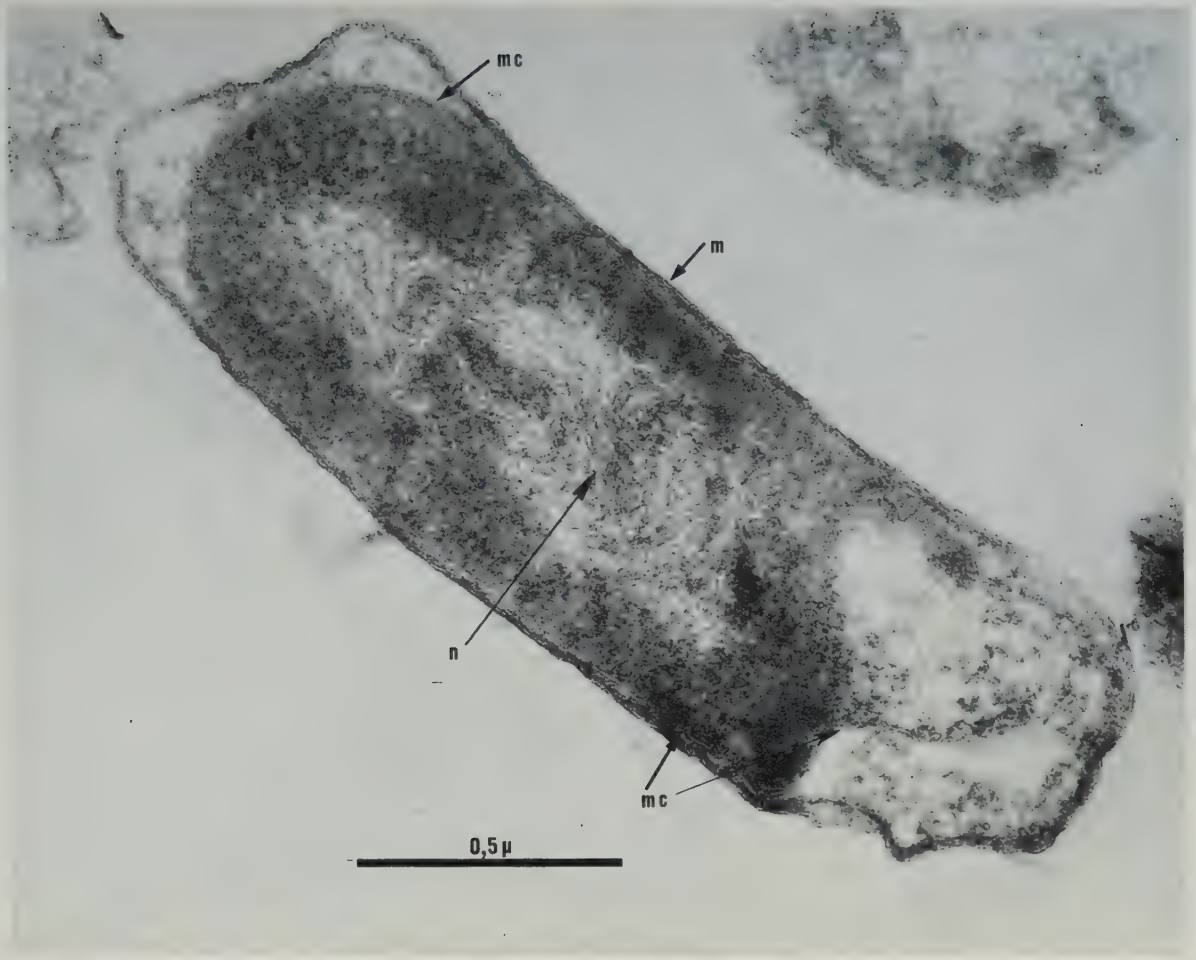
CLICHE 17 - Sphéroplaste dégénéré. Noter la disparition partielle du mur. Le sphéroplaste est limité par la membrane cytoplasmique qui paraît rompue par endroit. Noter la présence de formations membranaires intra-cytoplasmiques délimitant une vacuole à l'intérieur du cytoplasme. Comparer cette forme avec les germes normaux voisins.

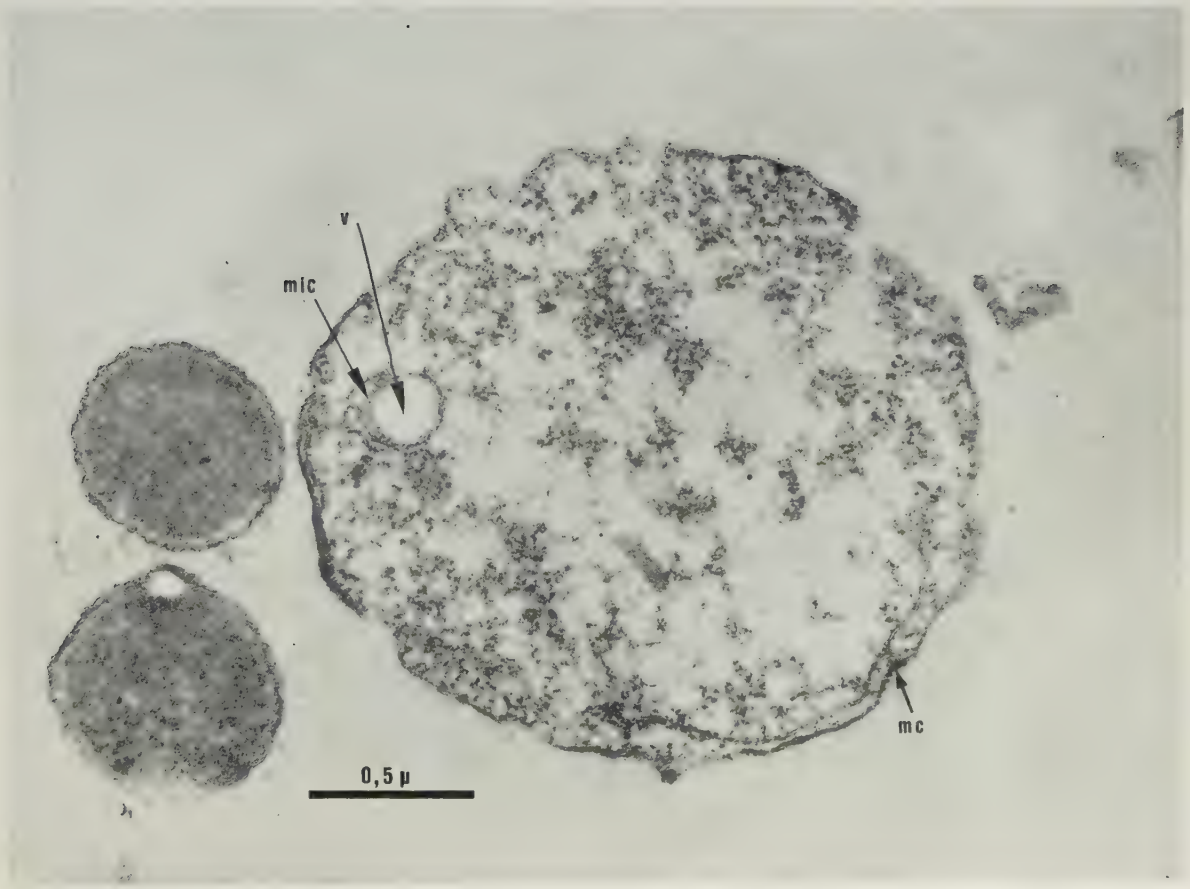
CLICHE 18 - Formes microbiennes gonflées à contour arrondi correspondant au premier type de germes rencontrés après traitement à la pénicillamine.
Noter le décollement périphérique entre la membrane cytoplasmique et le mur. Il semble qy'il y ait du matériel entre ces deux formations à l'endroit où la membrane cytoplasmique est la plus décollée.

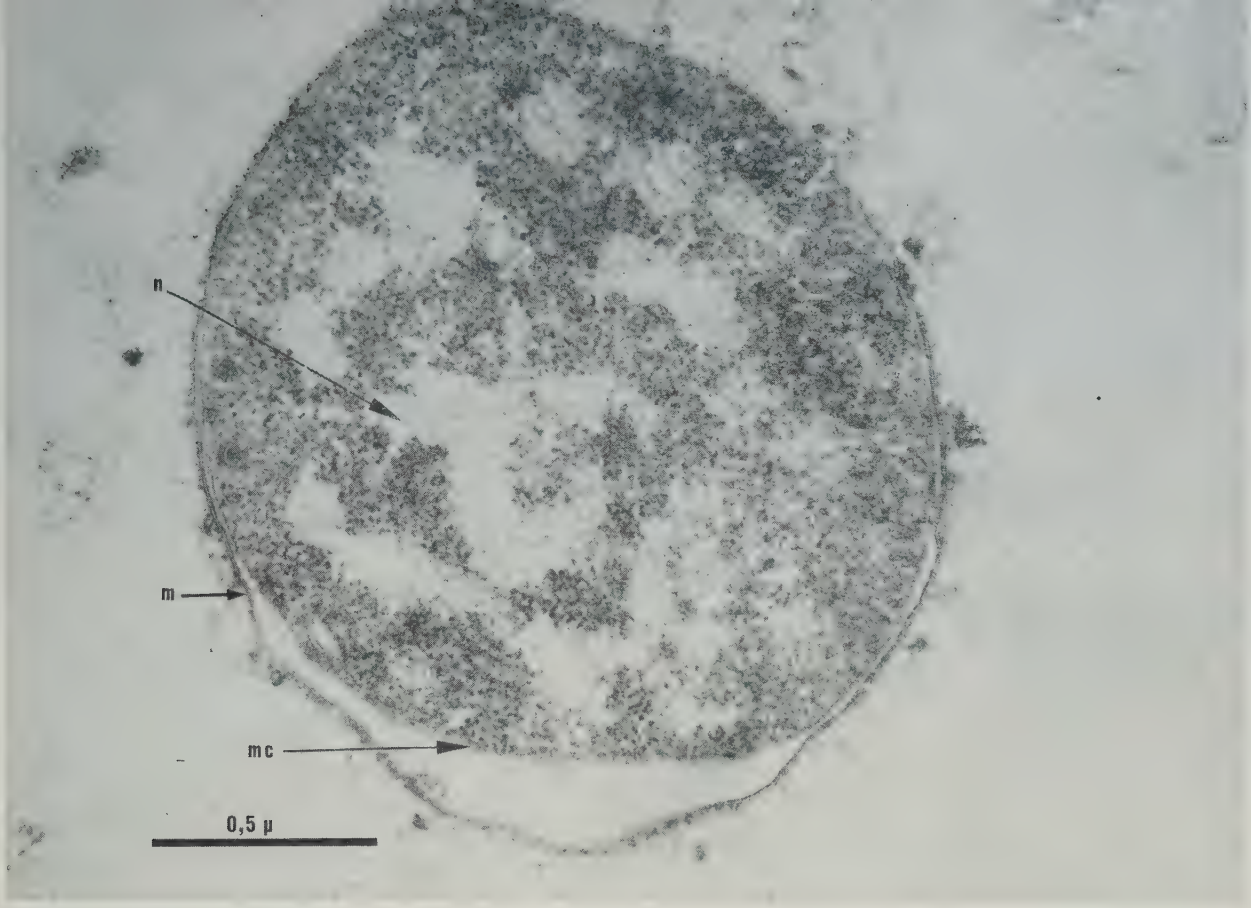
CLICHE 19 - Petit sphéroplaste. Noter le décollement de la membrane cytoplasmique par rapport à la paroi et l'aspect dispersé du noyau.

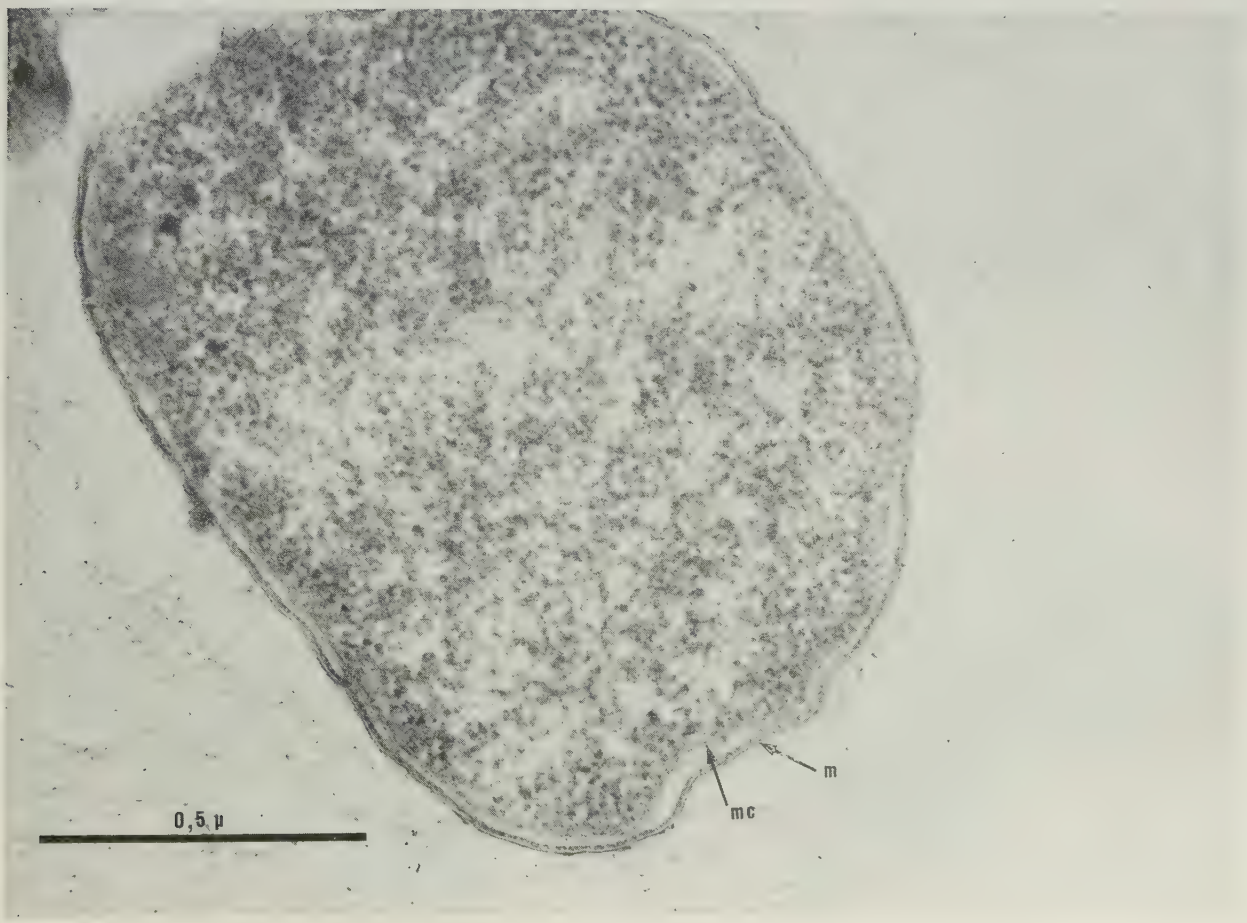
CLICHE 20 - Sphéroplaste dégénéré. Il ne reste plus qu'une petite masse cytoplasmique limitée par la membrane cytoplasmique. On ne peut plus distinguer la structure de la paroi amincie qui limite le sphéroplaste.

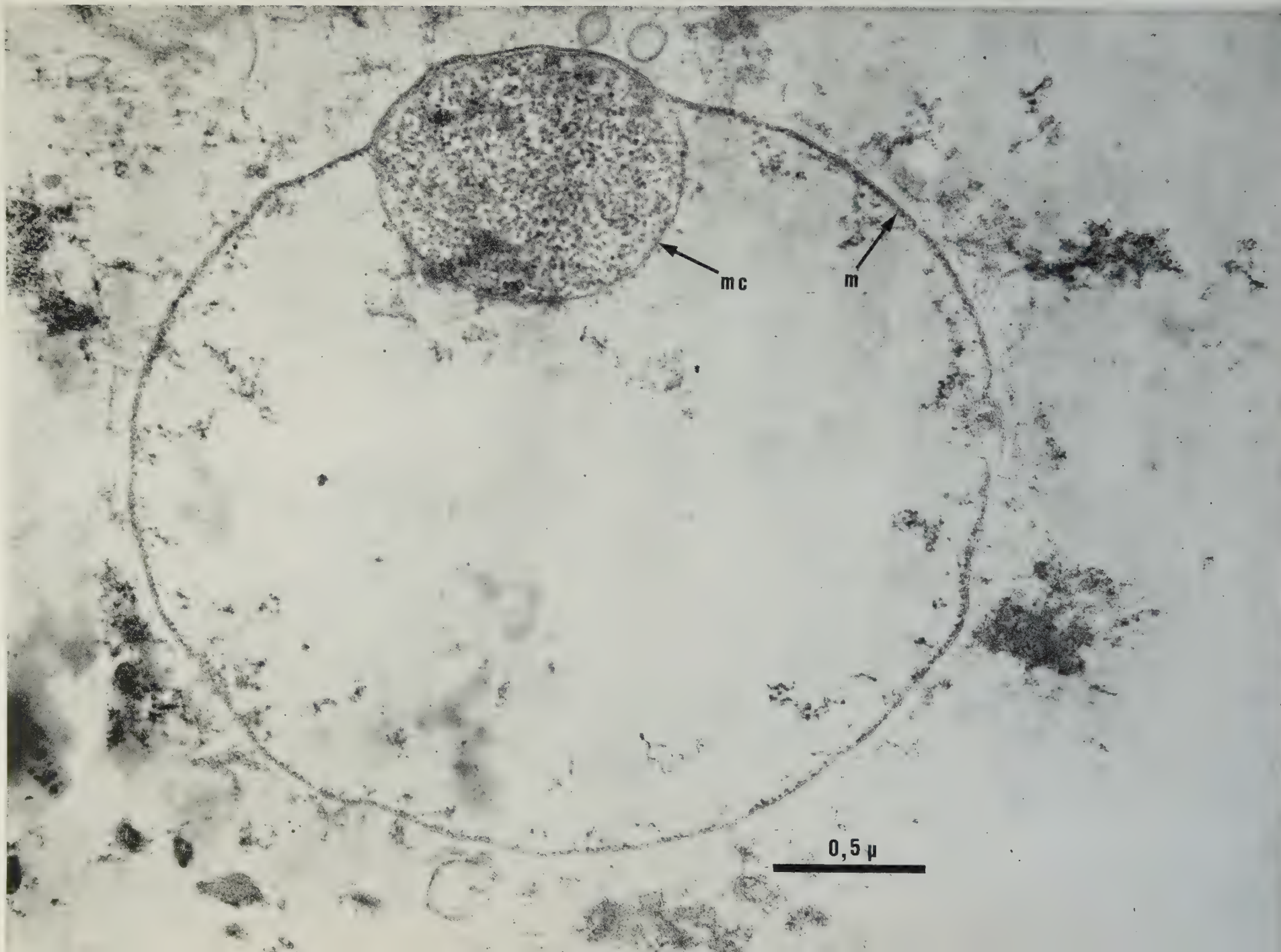
CLICHE 21 - Formation d'un sphéroplaste par rupture de la paroi sous l'action de la pénicillamine. Le mur s'est rompu, s'est replié sur lui-même. Il reste encore quelques sites d'adhérence entre le mur et la membrane cytoplasmique.


mc
m
n
mc
0,5 µ


v
mic
mc
0,5 µ


n
m
mc
0,5 µ


m
mc
0,5 µ


mc
m
0,5 µ

m
mc
0,5 µ

Chapitre II

LES EFFETS DE LA PENICILLAMINE SUR QUELQUES ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES DES ENTEROBACTERIES

En considérant l'augmentation de volume que subit le germe lorsqu'il est sphéroplastisé, on est amené à penser qu'il doit y avoir une très forte pénétration d'eau à travers les membranes correspondant à une perturbation de la perméabilité bactérienne.

En outre, nous avons noté une accumulation du matériel cellulaire dans le périplasme des bactéries, matériel qui a pu traverser la membrane cytoplasmique. Ceci expliquerait la diminution apparente du volume du contenu cellulaire dans le sphéroplaste. Lors de la rupture secondaire de la paroi bactérienne, il y aurait libération dans le milieu extérieur de ces éléments cytoplasmiques qui seraient perdus définitivement par le germe. Si cette observation est le reflet de la réalité, la modification de la perméabilité cellulaire doit se traduire au niveau d'activités enzymatiques.

L'étude en sera difficile car la pénicillamine ne modifie pas tous les éléments de la population avec la même intensité, mais l'effet résultant peut être une approche satisfaisante : une augmentation ou une diminution de l'activité d'une enzyme endocellulaire prouvera une modification de la perméabilité cellulaire.

- ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR DEUX ACTIVITES ENZYMATIQUES -

Deux activités vont être étudiées, celle de la βgalactosidase et de la βlactamase d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 et K_{12}.

I. MATERIEL ET METHODES.

I - Les activités β lactamasiques d'*Escherichia coli* K_{12} ont été mesurées en utilisant la méthode iodométrique décrite précédemment. Les quantités d'acide pénicilloïque formées par le germe cultivant en milieu B.P.G. en présence de 2,9 µ moles de benzylpénicilline ont été dosées après 6 heures et 24 heures d'incubation. Les inoculums sont obtenus de la manière suivante. *Escherichia coli* K_{12} est cultivé 8 heures à 37°C en milieu B.P.G. en présence soit de 100 µ g par ml de pénicillamine, soit de 5 µ g par ml de benzylpénicilline, soit des deux substances introduites en même temps aux concentrations précédentes. Après incubation, les cultures sont centrifugées 30 minutes à 8.000 tours/minute, lavées à l'eau bidistillée stérile, puis mises en suspension en tampon phosphate pH = 7, 0,2 M, de façon à obtenir 500.000 germes par ml. La benzylpénicilline est alors introduite dans chaque tube.

II - Les activités β galactosidiques d'*Escherichia coli* K_{12} et O_{111} B_4 , ont été mesurées par la méthode de BEGGS et ROGERS (17).

Le milieu de culture utilisé est le suivant :

Citrate de Na ..... 0,5 g
SO_4 Mg, 7 H_2 O ..... 0,7 g
Cl Na ..... 1 g
PO_4 H_2 K ..... 1 g
PO_4 H K_2 ..... 1 g
SO_4 $(NH_4)2$ ..... 4 g
Eau distillée Q.S.P.... 1 l.

Le milieu est stérilisé par traitement 15 minutes à l'autoclave à 120°C. La source de carbone est 5 mg/ml de glycerol.

L'inoculum est obtenu de la manière suivante. Dans un Kjeldalh de 250 ml, on introduit 80 ml de milieu de culture stérile auquel on a rajouté le glycérol et 2 µ g par ml de nicotinamide. Le milieu ensemencé est soumis 18 heures à l'agitation à 37°C. Deux échantillons sont ainsi préparés, l'un contient 100 µg par ml de pénicillamine, l'autre sert de témoin. Pour chaque culture, deux ballons seront ensemencés avec 3 à 5 pour cent de l'inoculum précédent. La première contient 80 ml de milieu, du glycérol et de la vitamine P.P. et 1 µ mole par ml d'isopropyl thiogalacto-pyranoside(ITPG), jouant le rôle d'inducteur de la β galactosidase. La seconde contient en supplément 100 µg par ml de pénicillamine.

Ainsi pour une souche, quatre échantillons différents seront étudiés toutes les 20 minutes. Pour chaque suspension bactérienne, dans deux tubes à hémolyse, on répartit 0,2 ml de milieu de culture ensemencé + 0,6 ml de tampon phosphate 0,02 M à pH = 7,5 + 0,2 ml O N P G 0,005M + 2 ml de $CO_3 Na_2$ M. Dans un tube à hémolyse, on ajoute 100 µg par ml de pénicillamine.

Les activités β galactosidasiques seront exprimées en µ moles d'ONPG dégradé en une heure par ml.

II. RESULTATS.

A. INFLUENCE DE LA PENICILLAMINE SUR L'ACTIVITE DE LA β LACTAMASE.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 32 : il apparait que la culture d'*Escherichia coli* en présence de 100 µ g par ml de pénicillamine augmente d'une manière appréciable la quantité de β lactamase puisqu'après 24 heures de contact, les quantités d'acide pénicilloïque formées augmentent de 1,23 à 1,32 µ moles par ml. Si le dosage avait été fait sur une culture pure de sphéroplastes, l'effet aurait été plus prononcé.

Temps de culture 18 h à 37°C.	*Inoculum E.coli K_{12} 500.000 germes/ml*	*Même inoculum + 100 µ g/ml de pénicillamine*	*Même inoculum + 5 µg/ml de benzylpénicilline*	*Même inoculum + 100 µ g/ml de pénicillamine + 5 µg/ml de benzylpénicilline*
0 heure	+ 2,9 µ moles de benzylpénicilline			
6 heures	0,65	0,70	0,66	0,82
24heures	1,23	1,32	1,31	1,65

Tableau 32 - Activité β lactamasique d'Escherichia coli K_{12}
Les quantités d'acide pénicilloïque formées sont exprimées en µ moles/ml.

Très intéressante est l'observation de l'activité β lactamasique lorsque le germe est cultivé en présence de 5 µg par ml de pénicilline. D'après WARREN (250) (251) cette quantité de pénicilline modifierait la perméabilité bactérienne de *Staphylococcus aureus* et favoriserait l'action lytique du lysozyme. Les dosages iodométriques permettent de montrer que la benzylpénicilline introduite en quantité infime modifie la perméabilité de manière comparable à la pénicillamine. Mais, si on additionne 100µg par ml de pénicillamine et 5 µ g par ml de benzylpénicilline, on potentialise fortement les modifications de perméabilité et les quantités d'acide pénicilloïque formées augmentent de 1,23 à 1,65 µ moles par ml après 24 heures de contact. Si 1 µ mole par ml de lysozyme est ajoutée dans le tube contenant l'inoculum en même temps que les 2,9 µ moles de benzylpénicilline, il apparaît que les quantités d'acide pénicilloïque formées sont après 6 heures de contact de 0,935 µ moles par ml et après 24 heures de 1,90 µmoles par ml.

De ces expériences, nous pouvons conclure que :

1°. la pénicillamine modifie la perméabilité bactérienne avec une intensité faible mais comparable à de très faibles quantités de benzylpénicilline.

2°. la pénicillamine lorsqu'elle agit en même temps que 5 µ g par ml de benzylpénicilline, modifie fortement les activités métaboliques, puisque l'activité de la β lactamase augmente de 20 pour cent.

3°. le lysozyme renforce l'action de la pénicillamine.

B. INFLUENCE DE LA PENICILLAMINE SUR L'ACTIVITE DE LA β GALACTOSIDASE.

1 - Escherichia coli O_{111} B_4 .

Si nous comparons les résultats obtenus selon les différents protocoles opératoires déjà décrits (tableau 33), il apparaît que la pénicillamine augmente l'activité de la βgalactosidase, quel que soit le temps d'introduction du métabolite. (voir tableau 33 page suivante).

Cent µ g par ml de pénicillamine ajoutés en même temps que l'ONPG augmentent l'activité de l'enzyme de plus de 25 pour cent. Ils joueraient donc un rôle comparable au toluène en modifiant la perméabilité des germes. Si la pénicillamine est ajoutée aussi dans les premiers temps de l'expérimentation, on obtient alors une augmentation d'activité de l'enzyme de l'ordre de 40 pour cent.

Il apparaît donc que plus le germe est cultivé en présence de pénicillamine, plus la quantité de substrat dégradé est augmentée. L'action de la pénicillamine paraît donc très nette sur la β galactosidase *d'Escherichia coli* O_{111} B_4 .

1ère CULTURE	MILIEU SYNTHETIQUE				MILIEU SYNTHETIQUE + 100µg par ml de pénicillamine			
2ème culture	I T P G		I T P G + pénicillamine		I T P G		I T P G + pénicillamine	
	Suspension bactérienne + O N P G	Suspension bactérienne + pénicillamine + O N P G	Suspension bactérienne + O N P G	Suspension bactérienne + pénicillamine + O N P G	Suspension bactérienne + O N P G	Suspension bactérienne + pénicillamine + O N P G	Suspension bactérienne + O N P G	Suspension bactérienne + pénicillamine + O N P G
E.coli O_{111} B_4	4,6	6,2	5	10,2	4,3	10,2	9,2	10
E. coli K_{12}	12	16,6	4,3	6,5	5	6,4	1,8	6,2

Tableau 33 - Influence de la pénicillamine sur l'activité de la β galactosidase d'Escherichia coli.

Les résultats sont exprimés en µ moles / ml d'ONPG dégradées en 1 heure selon la méthode de BEGGS et ROGERS.

2 - *Escherichia coli* K_{12}.

Escherichia coli K_{12} possède une β galactosidase cryptique . Aussi avec cette souche nous aurions voulu retrouver les résultats précédents pour pouvoir affirmer que l'augmentation d'activité de l'enzyme par la pénicillamine était une conséquence de la modification de la perméabilité cellulaire.

Les dosages après 24 heures de culture en présence de l'inducteur sont inscrits dans le tableau 33. Il apparaît très nettement que la pénicillamine, quand elle est ajoutée au dernier stade de l'expérimentation, joue le même rôle que le toluène en favorisant une dégradation plus accentuée du substrat. Par contre, si la pénicillamine est présente dès la première culture d'*Escherichia coli* K_{12} C_{600}, on observe une très nette diminution de l'activité de l'enzyme. Plus le contact entre la pénicillamine et le germe sera prolongé plus la quantité de β galactosidase active diminue.

L'explication du phénomène est peut-être la suivante. En milieu synthétique où la seule source de carbone est le glycérol, le coli K_{12} se développe mal en présence de pénicillamine. Les inoculums sont ajustés au spectrophotomètre à λ = 670 m µ, ainsi il est difficile de savoir si la diminution apparente de l'activité enzymatique est due uniquement à une perte d'enzyme ou si le phénomène n'est pas amplifié par une altération partielle des germes.

Il est important cependant de constater que la pénicillamine est capable de perturber fortement non seulement les activités enzymatiques des souches étudiées puisque 50 pour cent de l'activité β galactosidique disparaît mais aussi la croissance d'*Escherichia coli* K_{12} . Ces deux sortes de résultats nous paraissent très importants car la pénicillamine interfère peut-être au niveau de la synthèse enzymatique.

Deux activités enzymatiques endocellulaires d'*Escherichia coli* sont donc modifiées par la pénicillamine. Sans approfondir l'importance de l'action, nous pouvons en conclure que la pénicillamine est capable de perturber fortement la perméabilité bactérienne. Or, depuis les travaux de ASBELL et EAGON (11) et d'HAMILTON MILLER (97), le rôle des cations bivalents comme le Ca^{++} et le Mg^{++} dans le maintien de la rigidité de la paroi et la perméabilité de la membrane cytoplasmique n'est plus à démontrer. Comme il est connu que la pénicillamine est une molécule utilisée comme agent chélateur dans la maladie de Wilson (206) et le saturnisme (6) (128) (261) et bien que son affinité pour les cations divalents type Ca^{++} et Mg^{++} soit faible, nous avons pensé qu'elle pouvait agir de cette manière au niveau des membranes bactériennes.

Pour le prouver, nous avons mené une étude en deux temps. Nous avons cherché si :

1°. in vitro, la pénicillamine a une action chélatrice sur les cations divalents comme le Ca^{++} et le Mg^{++}.

2°. In vivo, la pénicillamine perturbe le métabolisme du Ca^{++} et du Mg^{++} en dosant les cations par radio activité et par spectrophotométrie d'absorption atomique.

- ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES IONS Ca^{++} et Mg^{++} -

I. MATERIEL ET METHODES.

A. ETUDE IN VITRO DE L'ACTION CHELATRICE DE LA PENICILLAMINE SUR LE Ca^{++} et le Mg^{++}.

L'étude a été faite en eau bidistillée bouillie pH = 6,8. Le Mg^{++} est apporté sous forme de Cl_2Mg, le Ca^{++} sous forme de Cl_2 Ca.

Les concentrations de pénicillamine varient de 10 à 100 µ g soit de 0,04 à 0,4 µ mole par ml, celles de Mg^{++} de 0,255 à 255 µg, soit de 0,001 à 10 µmoles par ml, celles de Ca^{++} de 0,32 à 320 µg, soit de 0,008 à 8 µmoles par ml.

La technique de PAL permet de doser la quantité de pénicillamine dont la fonction -SH est libre.

B. MESURES RADIO ACTIVES EN UTILISANT DU ^{45} Ca.

Les pénicillamines utilisées sont d'origine commerciale (NBC) la souche est *Escherichia coli* O_{111} B_4 . Les conditions de culture en milieu B.P.G. sont celles utilisées pour obtenir des sphéroplastes pénicillamine. Après 4 heures d'incubation, les bactéries sont recueillies sur des filtres Millipore G.S.W.P. 0,4 µ qui seront collés dans des coupelles métalliques, séchés, puis placés dans un compteur Geiger Tracerlab.

Le ^{45}Ca est utilisé à la concentration de 50.000 coups/mn par ml. Le ^{40}Ca est utilisé comme entraineur.

C. MESURES PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE.

Dans cette expérience la pénicillamine utilisée est d'origine chimique et provient de l'hydrolyse d'une solution de 6 APA Bristol.

La solution d'E D T A est utilisée en tampon Tris 0,02 M à pH = 8. La souche et les conditions de culture sont celles décrites précédemment. Après 18 heures d'incubation à 37°C, les bactéries sont recueillies sur membrane Millipore et les filtrats stériles sont conservés.Les membranes et les germes sont minéralisés selon la technique de Kjeldahl puis les

solutions sont neutralisées à la lessive de Na OH en présence de phénolphtaleine. Par spectrophotométrie d'absorption, les quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} présentes sont déterminées dans un Unicam SP 90, le Ca^{++} à la λ= 422 m μ le Mg à la λ= 285,2 M μ, par rapport à une courbe étalon.

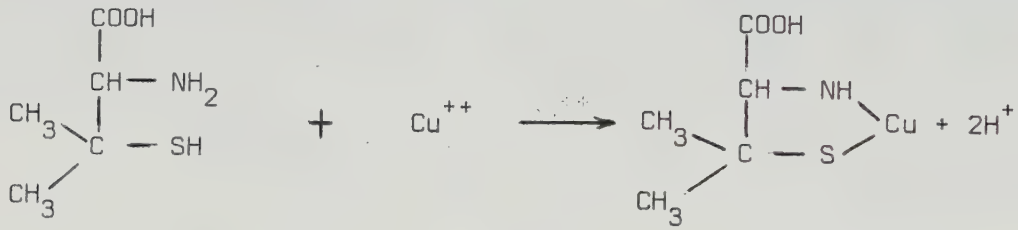
Tous les résultats sont exprimés en mg de poids sec de bactéries par ml.

II. RESULTATS.

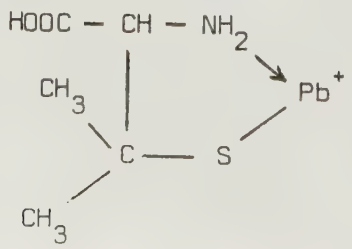
A. PROPRIETES CHELATRICES DE LA PENICILLAMINE.

D'après DOORNBOS et FABER (49), la chelation des cations divalents par la pénicillamine fait intervenir les groupements $-NH_2$ et -SH (150) (176).

Dans le cas de la chélation du Cu^{++}, une molécule de pénicillamine chélate un atome de Cu^{++}. Le cation est lié covalentiellement au soufre et à l'azote. La fonction $-NH_2$ ne réagit plus à la ninhydrine. La formule est la suivante.



Les autres cations divalents sont chelatés par la pénicillamine dans un rapport différent, c'est ce que démontrent KUCHINSKAS et ROSEN (125) en utilisant la méthode de titration potentiométrique de BJERRUM. Les courbes accusent deux paliers différents, donc deux atomes d'H^+ sont bien libérés par molécule de pénicillamine, mais le chélate est formé dans le rapport suivant : deux molécules de pénicillamine pour 1 atome de cation divalent. ALBERT (7) LI et ALL (138) (139) comparent ces chélates à ceux obtenus avec la cystéine. Ils ont montré que la fonction -COOH reste libre et que les ions soufre et azote interviennent. Leur représentation moléculaire est la suivante



D'après ces auteurs, la pénicillamine chélate le Ca^{++} et le Mg^{++} comme le Pb, mais avec une très faible affinité. In vitro, nous allons étudier l'importance du phénomène.

B. ACTION IN VITRO DE LA PENICILLAMINE SUR LES IONS Ca^{++} et Mg^{++}.

Dans la représentation moléculaire du chélate donnée ci-dessus, la fonction -SH est transformée en fonction -S-, donc la technique de PAL ne permet plus de doser la pénicillamine. C'est en suivant dans le temps la diminution des fonctions -SH libres, par rapport à une solution témoin de pénicillamine, que la vitesse de formation du chélate est appréciée.

a - Concentrations variables de pénicillamine.

1 - Chélation du Mg^{++} (figure 15).

A une galerie de 10 tubes contenant des concentrations décroissantes de pénicillamine allant de 100 à 10 µ g par ml, du Cl_2 Mg est ajouté de façon à obtenir dans chaque tube une concentration de 0,1 pour cent.

Les dosages ont été faits au temps to après 4 heures et 6 heures de contact à 37°C.

Il y a une très nette diminution des fonction -SH libres en fonction du temps. Au bout de 4 heures, quelles que soient les quantités de pénicillamine présentes, 40 µg par ml de pénicillamine au moins, ne sont plus dosables, au bout de 6 heures, environ 90 µg par ml ne le sont plus.

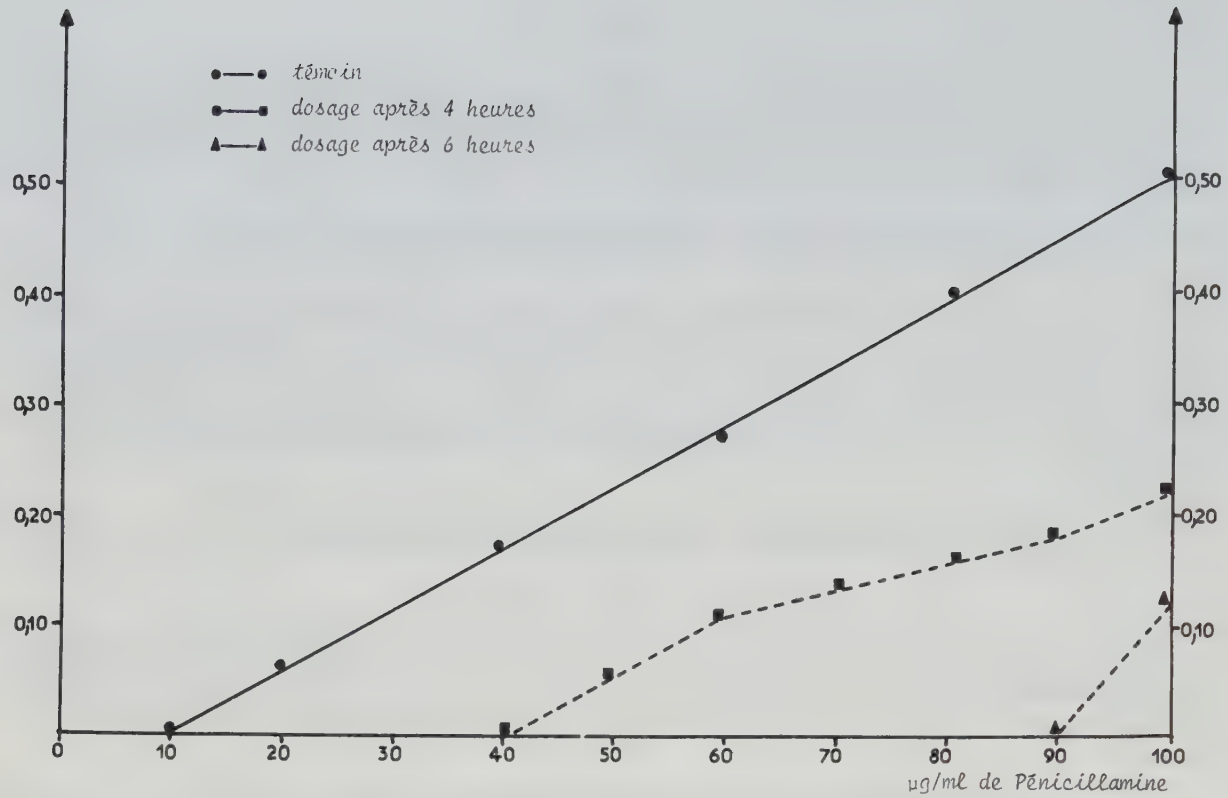
Donc de très faibles quantités de pénicillamine, en présence de très fortes concentrations de Cl_2 Mg sont devenues lentement indosables par la méthode colorimétrique de PAL.

2 - Chélation du Ca^{++} (figure 16).

Dans les mêmes conditions opératoires, nous avons dosé la fonction -SH de la pénicillamine en présence de 0,1 pour cent de Cl Ca. La figure 16 montre les résultats obtenus après 4 heures, 6 heures et 7 heures de culture. Il apparaît nettement que le Ca^{++} est moins fortement chélaté par la pénicillamine que le Mg^{++} puisque après 7 heures de contact à 37°C, 60 µg par ml de pénicillamine seulement ne sont plus dosables.

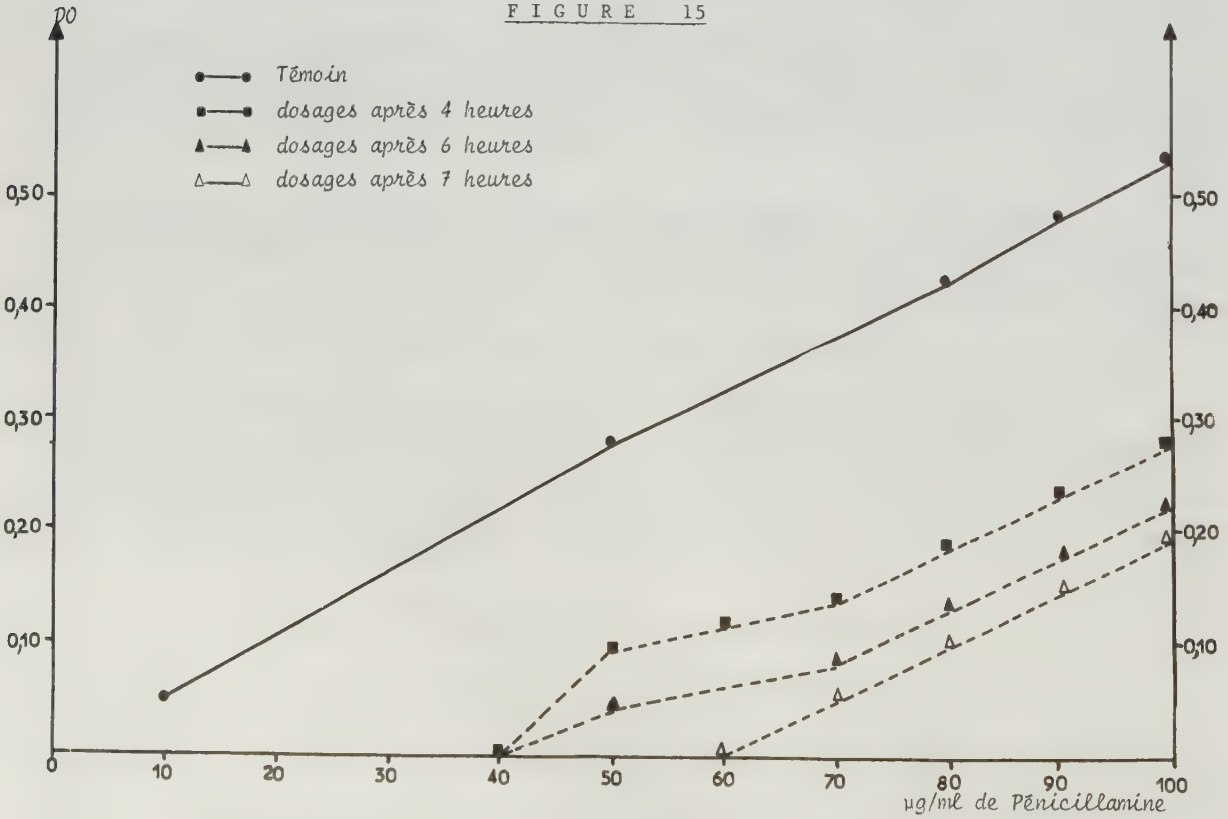
3 - Chélation du Ca^{++} et du Mg^{++}. (figure 17).

En solution aqueuse, la pénicillamine chélate plus lentement les cations divalents, lorsqu'ils sont associés. En effet, la courbe 17 représente la disparition de la fonction -SH en présence de Cl_2 Ca et Cl_2 Mg, chaque sel étant à la concentration de 0,1 pour cent. Au bout de 8 heures, 70 µg par ml de pénicillamine seulement ne sont plus dosables, donc le cation Mg^{++} seul est chélaté plus rapidement par la même



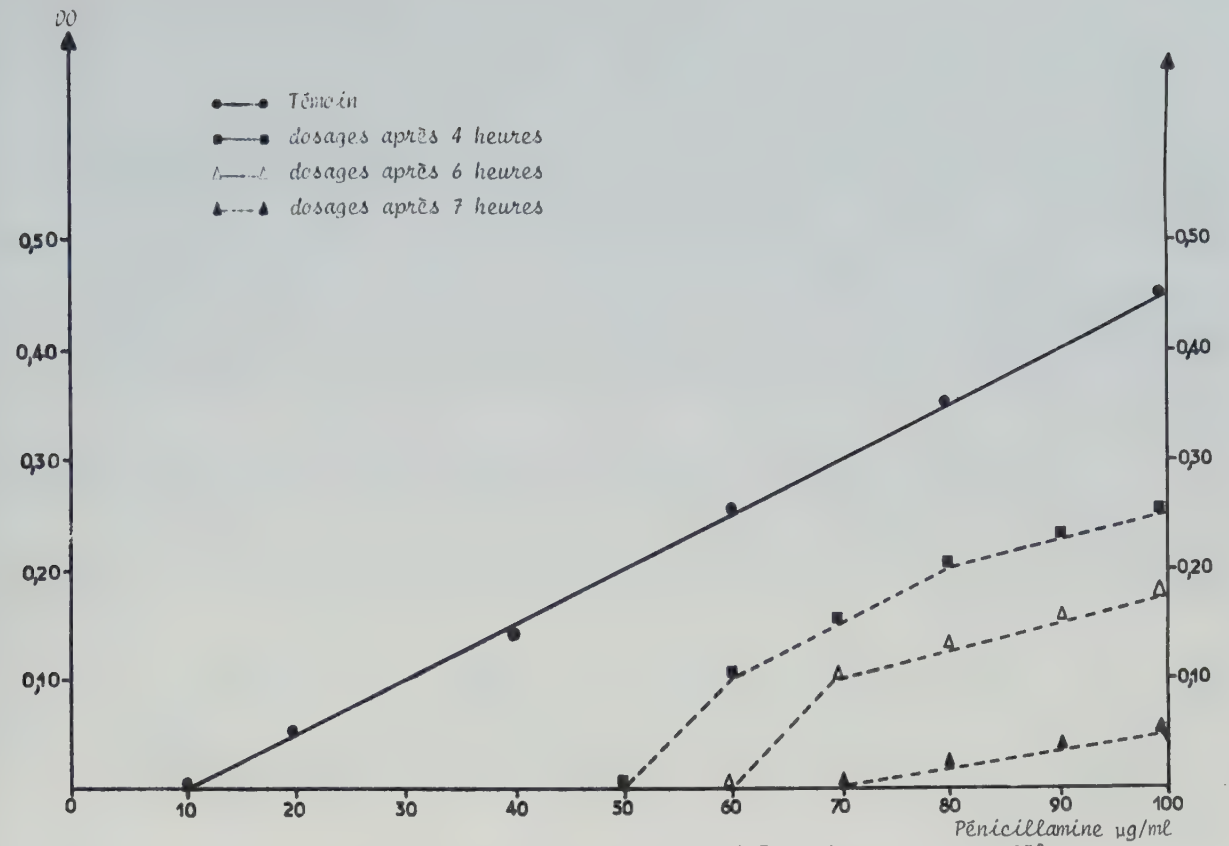
VITESSE DE CHELATION PAR LA PENICILLAMINE DE 0,1 % DE Cl_2Mg A 37°C

FIGURE 15



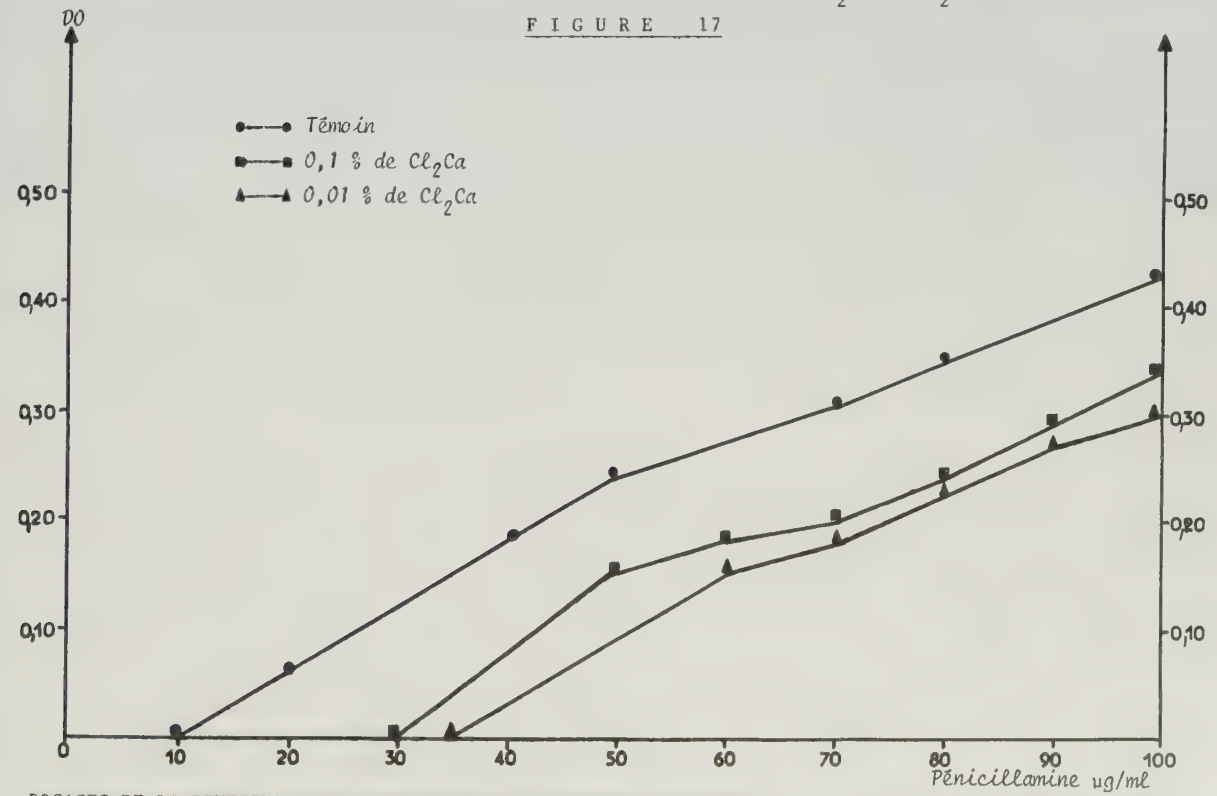
VITESSE DE CHELATION PAR LA PENICILLAMINE DE 0,1 % DE Cl_2Ca A 37° C

FIGURE 16



VITESSE DE CHELATION PAR LA PENICILLAMINE DE 0,1 % DE Cl_2Ca ET Cl_2Mg A 37° C

FIGURE 17



DOSAGES DE LA PENICILLAMINE EN PRESENCE DE QUANTITES VARIABLES DE Cl_2Ca APRES 5 H DE CONTACT A 37°C

FIGURE 18

quantité de pénicillamine. Il apparaît que l'affinité de la pénicillamine pour le Ca^{++} et le Mg^{++} est assez faible et que la formation des chélates exige plusieurs heures et une température de 37°C .

KUCHINSKAS et ROSEN ont montré que le rapport stoechiométrique est de deux molécules de pénicillamine pour un atome de cations. Pour obtenir le rapport 2 : 1, il faut ajouter à 0,4 µ mole de pénicillamine, 0,2 µ mole de Ca^{++}, ce qui correspond à 0,0025 pour cent de Cl_2Ca. Dans le cas du Mg^{++}, pour avoir le même rapport, il faut ajouter 0,0020 pour cent de Cl_2 Mg.

Les concentrations de cations utilisées précédemment sont donc très excédentaires par rapport à celles de pénicillamine. La figure 18 est une approche qui permet d'observer que la pénicillamine chélate plus rapidement le Ca^{++} en présence 0,01 pour cent de Cl_2 Ca que de 0,1 pour cent.

b - Concentrations variables de Ca^{++} ou de Mg^{++} (figure 19).

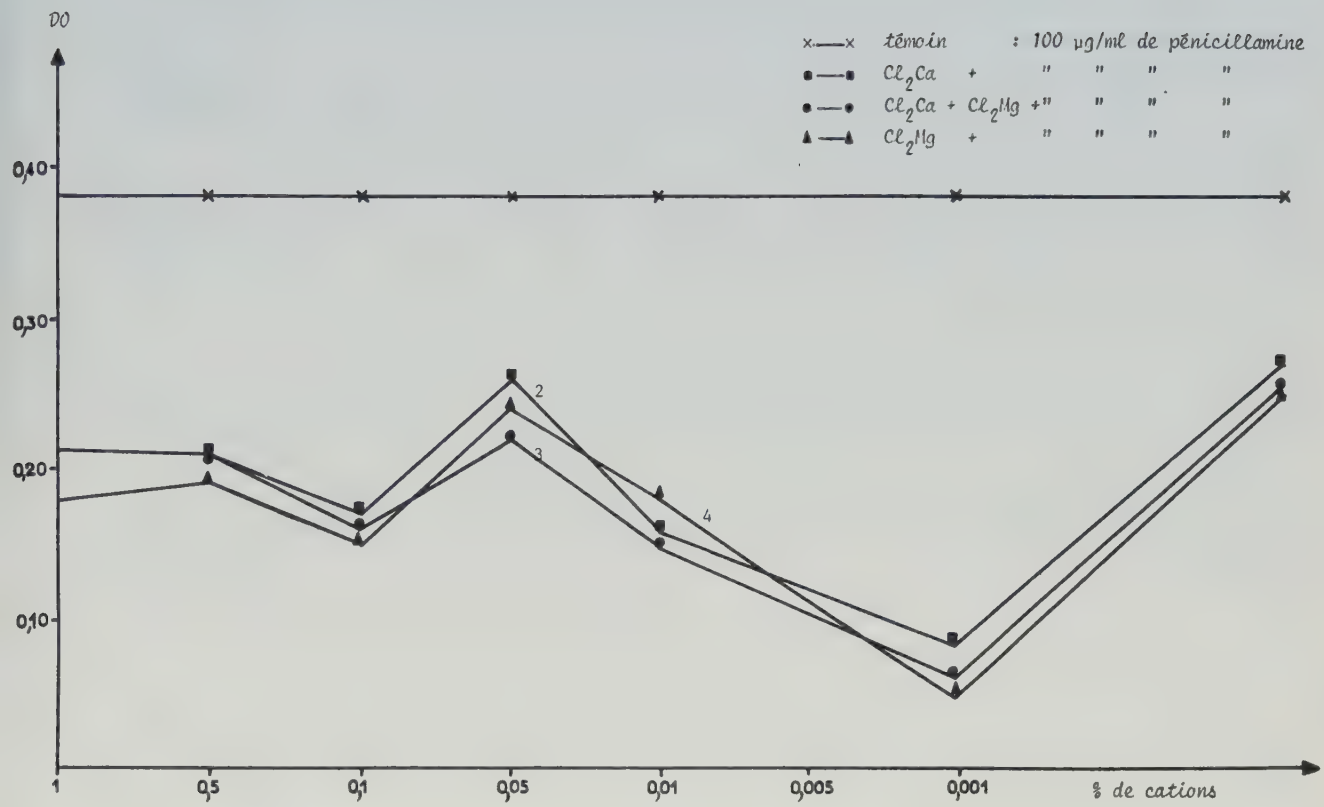
Dans trois galeries contenant 100 µg par ml de pénicillamine, on a ajouté dans la première du Cl_2 Ca, dans la seconde du Cl_2 Mg, dans la troisième du Cl_2 Ca + Cl_2 Mg . Les concentrations de pénicillamine sont constantes,celles deschlorures sont de 10 - 5 - 1 - 0,5 - 0,1 - 0,05 0,01 -0,005 - 0,001 pour cent.

La figure 19 vérifie le résultat précédent et montre que la chélation est d'autant plus rapide que l'on est près du rapport 2 : 1 . Dans ces conditions au bout de 3 heures, il ne reste que 30 µg par ml de pénicillamine dosable, au bout de 5 heures toute la pénicillamine est engagée dans la chélation.

c - Etude de la chélation par la pénicillamine des cations divalents dans les milieux de culture.

Les mêmes expériences ont été faites en milieu B.P.G. et en milieu Penassay. Ces milieux contiennent des ions Ca^{++} et Mg^{++} liés plus ou moins étroitement aux peptones : le milieu Penassay est moins riche en cations divalents que le milieu B.P.G. Les valeurs seront données ultérieurement.

Des galeries contenant comme précédemment des quantités fixes de pénicillamine et des concentrations variables de cations, ou inversement, des quantités variables de pénicillamine et des concentrations fixes de cations ont été réalisées. Dans chaque cas, des résultats semblables à ceux décrits en eau distillée ont été obtenus. Toutefois, la chélation se fait plus rapidement en milieu Penassay qu'en milieu B.P.G. Par exemple, en 6 heures, 200 µg par ml de pénicillamine en présence de 0,1 pour cent de Cl_2 Mg ne sont plus dosables en milieu Penassay, alors que 40µ g par ml le sont encore en milieu B.P.G. Ce phénomène avait déjà été observé lorsque nous avions étudié le rôle du Ca^{++} et du Mg^{++} sur la pénicillamine produite par *Escherichia coli* O_{111} B_4 : la pénicillamine d'origine enzymatique disparaît plus rapidement en milieu Penassay qu'en milieu B.P.G.



DOSAGES DE LA PENICILLAMINE EN PRESENCE DE QUANTITES VARIABLES DE CATIONS
3 HEURES DE CULTURE A 37°C

FIGURE 19

De cette étude il ressort que des quantités de pénicillamine aussi faibles que 100 et même 50 µg par ml sont capables de fixer de faibles quantités de cations divalents non seulement quand ces derniers sont libres en solution aqueuse, mais aussi dans des milieux de culture complexe. Donc elles peuvent avoir une action chélatrice sur ceux présents dans les germes, action comparable à l'E.D.T.A.

C. ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES CATIONS DIVALENTS BACTERIENS.

Cette action a été atudiée par deux méthodes différentes :

1 - par utilisation du ^{45}Ca.
2 - par dosage de cations après minéralisation des bactéries au spectrophotomètre d'absorption atomique.

1 - Etude par mesure de la radioactivité du ^{45}Ca.

Cette méthode ne permet pas d'apprécier le rôle exclusif de la pénicillamine sur le métabolisme microbien des cations divalents, puisque le ^{45}Ca doit obligatoirement être entraîné par du ^{40}Ca. Or, un excès de Ca^{++} dans le milieu de culture provoque une augmentation du Ca^{++} bactérien. Les quantités du ^{40}Ca seront variables dans l'expérimentation.

Les résultats obtenus sont cependant très intéressants.

a -^{40}Ca = 0,1 pour cent de Cl_2 Ca + 0,1 ml de ^{45}Ca.

Le tableau 34 présente les résultats obtenus en milieu B.P.G. après 4 heures de culture.

^{45}Ca	$Cl_2\ ^{40}Ca$	Saccharose	Cl_2Mg	Pénicillamine L	Pénicillamine D	Radio activité
0,1ml	0,1 %	-	-	-	-	10.000 cp/mn
0,1ml	0,1 %	+	-	-	100 µg	6.970 cp/mn
0,1ml	0,1 %	+	-	100µg	-	6.650 cp/mn
0,1ml	0,1 %	+	0,1 %	-	100 µg	15.900 cp/mn
0,1ml	0,1 %	+	0,1 %	100µg	-	12.400 cp/mn
0,1ml	0,1 %	-	-	-	100 g	5.400 cp/mn

Tableau 34 - Mesure de la radio activité d'Escherichia coli O_{111} B_4 cultivé 4 heures en présence de ^{45}Ca et de pénicillamine en milieu B.P.G.

Influence du Mg^{++} et de la tonicité du milieu. Les résultats sont exprimés par mg de poids sec de bactéries par ml.

Il apparaît nettement qu'en milieu iso et hypertonique, la pénicillamine,en présence de 0,1 pour cent de Cl_2 Ca,diminue l'incorporation normale du ^{45}Ca dans les germes. Le témoin donne par mg de poids sec 10.000 cp/mn. En présence de pénicillamine,en milieu hypertonique on enregistre 6.970 cp/mn en milieu isotonique 5.400 cp/mn. Près de la moitié du ^{45}Ca n'est pas incorporée.

Si 0,1 pour cent de Cl_2 Mg sont ajoutés au système précédent, il semble que le ^{45}Ca pénètre au contraire plus facilement dans les germes. On enregistre 15.900 cp/mn en présence de D pénicillamine en milieu hypertonique.

La pénicillamine semble modifier fortement l'équilibre ionique du Ca^{++} des bactéries. En fonction de la nature du cation en excès, les résultats sont très différents, comme si les cations déplacés pouvaient se remplacer.

b - ^{40}Ca = 0,001 pour cent de Cl_2 Ca + 0,1 ml de ^{45}Ca.

Dans ces conditions, les résultats sont comparables comme le montre le tableau 35, mais le ^{45}Ca pénètre moins bien dans les bactéries puisque le témoin ne donne que 4.480 cp/mn.

En milieu hypertonique, en présence de D pénicillamine, on enregistre 2.400 cp/mn, en présence de l'isomère L, 2.300 cp/mn. Les isomères D et L ont une affinité et une action comparable sur la fixation du Ca^{++} dans les germes.

c - Concentrations de pénicillamine variables.

Le tableau 35 indique les résultats obtenus en milieu hypertonique dans les mêmes conditions opératoires.

^{45}Ca	^{40}Ca	6 APA	Pénicillamine	Radioactivité
0,1 ml	0,1 %	-	-	9.700 cp/mn
0,1 ml	0,1 %	-	100 µ g/ml	5.900 cp/mn
0,1 ml	0,1 %	-	200 µ g/ml	4.050 cp/mn
0,1 ml	0,1 %	30 µg	100 µ g/ml	1.780 cp/mn
0,1 ml	0,1 %	30 µg	200 µ g/ml	1.800 cp/mn
0,1 ml	0,001%	-	-	4.400 cp/mn
0,1 ml	0,001%	-	100 µ g/ml	3.700 cp/mn
0,1 ml	0,001%	-	200 µ g/ml	4.600 cp/mn

Tableau 35 - Mesure de la radioactivité d'escherichia coli O_{111} B_4 cultivé 4 heures en présence de ^{45}Ca en milieu B.P.G. Influence des quantités de pénicillamine et de ^{40}Ca. Les résultats sont exprimés par mg de poids sec de bactéries par ml.

En présence de 0,1 pour cent de ^{40}Ca, les mêmes résultats que ceux précédemment décrits sont retrouvés. Le témoin donne 9.700 cp/mn : en présence de 100 µg par ml de pénicillamine, on enregistre 5.900 cp/mn en présence de 200 µg par ml de pénicillamine, 4.050 cp/mn. Il semble donc que la pénicillamine modifie la pénétration du ^{45}Ca. Elle est diminuée de 40 pour cent en présence de 100 µg par ml et de 52 pour cent en présence de 200 µg par ml.

En présence de 0,001 pour cent de Cl_2 Ca, le phénomène n'est pas comparable : 100 µg par ml diminuent seulement la pénétration du ^{45}Ca de 16 pour cent, 200 µg par ml semblent sans effet. Existerait-il un phénomène de zone entre la concentration de pénicillamine et la concentration de Ca ?

L'addition de 30 µg par ml de 6 APA potentialise l'action de la pénicillamine et le nombre de coup/mn tombe à 1780 ou 1.800.

De ces résultats, nous pouvons conclure que la pénicillamine, dans les quatre premières heures de culture, perturbe fortement le métabolisme du Ca^{++} dans les bactéries. Cette action semble cependant dépendante de la quantité de pénicillamine et de la quantité de cations présents dans le milieu. Par mesure au spectrophotomètre d'absorption atomique, nous allons doser les quantités exactes de Ca^{++} et de Mg^{++} présentes dans les germes et dans les milieux de culture après 18 heures d'incubation dans des conditions opératoires semblables.

2- *Mesure par spectrophotométrie d'absorption atomique.*

A.Cette méthode a permis de doser les quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} présentes dans les différents milieux de culture.

- le milieu B.P.G. contient 16,6 mg par litre de Mg^{++}
  9,7 mg par litre de Ca^{++}
- le milieu Penassay contient 2,6 mg par litre de Mg^{++}
  2,3 mg par litre de Ca^{++}

B.Cette méthode a surtout permis de doser les quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} dans les bactéries et les milieux de culture après 18 heures d'incubation. Le tableau 36 présente les différents résultats obtenus (voir tableau 36 page suivante).

a) Les témoins.

L'addition de 1 µmole de cations dans le milieu de culture modifie différemment les quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} présentes dans les germes, selon la nature du cation.

L'addition de 1 µmole de Ca^{++} augmente fortement les quantités de Ca^{++} puisqu'elles passent de 23 µg par mg de poids sec de bactéries à 41,4, mais ne modifie pas les quantités de Mg^{++}

Pénicillamine	Quantités de cations ajoutées au milieu de culture avant l'ensemencement			Quantité de cations dosées après 18 h d'incubation à 37°C.			
				dans les bactéries minéralisées		dans les surnageants	
	Ca^{++}	Mg^{++}	Zn^{++}	Mg^{++}	Ca^{++}	Mg^{++}	Ca^{++}
-	-	-	-	10	23	13	13,6
-	1 µmole	-	-	10	41,4	11,5	12
-	-	1 µmole	-	8,2	19,8	11	11,6
-	-	-	1µmole	7	18,4	11,1	10,6
-	1 µmole	1 µmole	1µmole	8	12,8	11	9,1
200 µg	-	-	-	5	8,8	16,6	7,6
100 µg	-	-	-	5	9,2	16,6	8,4
50 µg	-	-	-	5	9,6	14,5	8,4
25 µg	-	-	-	4,2	9,2	13	8,6
100 µg	1µmole	-	-	5,7	8,8	16,6	18,6
25 µg	1µmole	-	-	7	15,6	14,5	18,6
100 µg	-	1µmole	-	5,5	11,5	15	9,6
25 µg	-	1µmole	-	5,4	10,6	14,5	9,6
100 µg	-	-	1µmole	5,8	11,5	16	8,6
25µg	-	-	1µmole	5,4	10,6	13	8,4
200 µg	1µmole	1µmole	1µmole	4,7	17,5	16,6	18,3
100 µg	1µmole	1µmole	1µmole	5,6	13,8	15	18,6
50 µg	1µmole	1µmole	1µmole	4,8	23,5	14,5	18,4
25 µg	1µmole	1µmole	1µmole	6	13,8	11,8	19,3

Tableau 36 - Action de la pénicillamine sur le métabolisme des cations Ca^{++} et Mg^{++} chez Escherichia coli K_{12}

Les résultats sont exprimés en µg/ml de cations par Mg de poids sec de bactéries.

L'addition de 1 µ mole de Mg ou de Zn inhibe au contraire la pénétration du Ca^{++} et du Mg^{++} dans les bactéries, mais dans de faibles proportions.

L'addition de 1 µ mole de Ca^{++} + 1 µ mole de Mg^{++} + 1 mole de Zn^{++} diminue très fortement les taux de Ca^{++} plus faiblement ceux de Mg^{++}.

b) en présence de quantités variables de pénicillamine.

1 - l'addition de quantités de pénicillamine comprises entre 200 et 25 µg par ml perturbe le métabolisme du Ca^{++} et du Mg^{++} en diminuant de 50 pour cent les quantités de Mg et de 62 pour cent celle de Ca. 25 µg par ml de pénicillamine semblent diminuer davantage le taux de Mg^{++} que 50 ou 100 µg par ml.

2 - En présence de 25 ou 100 µg par ml de pénicillamine, l'addition de 1 µmole de Mg^{++} ou de Ca^{++} ou de Zn^{++} au temps t_o ne sont pas capables de neutraliser l'action de la pénicillamine et les quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} dosées dans les bactéries sont identiques à celles dosées en présence de pénicillamine seule. Il n'y a aucune reversion du phénomène.

3 - Si nous ajoutons au temps t_0 1µ mole de chaque cation en même temps que la pénicillamine, il apparaît que les quantités de Mg^{++} demeurent, quelles que soient les concentrations de pénicillamine, très inférieures au témoin de 35 à 55 pour cent. Celles de Ca^{++} au contraire sont fortement augmentées et, pour la concentration de 50 µg par ml de pénicillamine, égales au témoin.

Il apparaît donc que les métabolismes du Ca^{++} et du Mg^{++} évoluent indépendamment l'un de l'autre aussi bien chez les témoins que chez les germes traités par la pénicillamine. Le Mg^{++} semble être soumis à un mécanisme de régulation plus rigoureux que le Ca^{++} car un excès de Mg^{++} ne modifie pas son incorporation alors qu'un excès de Ca^{++} l'augmente.

Il apparaît que la pénicillamine diminue fortement les quantités de Ca^{++} et de Mg^{++}, même lorsqu'elle est présente à d'aussi faibles concentrations que 25 µg par ml.

L'action de la pénicillamine n'est pas inhibée par l'addition au temps 0 de cations divalents.

c) en présence de quantités variables d'E.D.T.A.

Dans les mêmes conditions opératoires, nous avons dosé dans les germes les quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} présentes après action d'E.D.T.A. sodique en tampon Tris 18 heures à 37°C.

Les résultats du tableau 37 montrent que l' E.D.T.A. diminue moins les quantités de cations des bactéries que la pénicillamine. 0,1 µ mole de pénicillamine diminue les quantités de Mg avec la même intensité que 1 µmole d'E.D.T.A. Vis-à-vis du Ca^{++}, l'E.D.T.A. se comporte comme la pénicillamine.

E.D.T.A. en mole	1 µ mole de cations ajoutées au milieu de culture avant l'ensemencement			Quantités de cations dosées après 18 heures d'incubation à 37°C.			
				dans les bactéries minéralisées		dans les surnageants	
	Ca^{++}	Mg^{++}	Zn^{++}	Mg^{++}	Ca^{++}	Mg^{++}	Ca^{++}
0,2	-	-	-	10	10,8	7,7	9,9
0,4	-	-	-	10	10,4	7,1	15,1
0,75	-	-	-	4,7	10,8	6,5	11,6
1	-	-	-	4,2	9,6	6,3	11,2
0,4	+	-	-	5	10,2	5,3	14,6
1	+	-	-	4	9,2	7,3	12,3
0,4	-	+	-	6	23,4	6,5	13,1
1	-	+	-	6	28,5	7,1	12,6
0,4	-	-	+	5,3	23,4	7,13	9,85
1	-	-	+	5	36,8	7,3	9,85
0,2	+	+	+	4,2	15,6	4,93	11,1
0,4	+	+	+	6,4	23	5,3	11,8
0,75	+	+	+	4,8	15,6	5,3	15,6
1	+	+	+	3,8	15,6	5,16	15,6

Tableau 37 - Action de l'E.D.T .A. sur le métabolisme des cations Ca^{++} et Mg^{++} chez Escherichia coli K_{12}

Les résultats sont exprimés en µg/ml de cations par Mg de poids sec de bactéries.

L'addition de 1 µ mole de cation soit de Ca^{++}, de Mg^{++} ou de Zn^{++} ne modifie pas les quantités de Mg, mais augmente fortement celles du Ca^{++}.

Les quantités de Ca^{++}, de Mg^{++} dosées dans les surnageants sont 2 à 3 fois plus faibles dans les milieux contenant de l'E.D.T.A. que celles dosées en présence de pénicillamine. L'E.D.T.A. pourrait donc chélater plus facilement les cations libres que ceux liés aux germes.

III. CONCLUSION.

Tous les résultats qui sont rapportés dans ce chapitre concernant les activités enzymatiques et les quantités de cations bivalents dosées chez les germes traités à la pénicillamine ont une valeur relative, puisque toute la population n'est pas altérée de manière homogène. Cependant, ils permettent de conclure que la pénicillamine n'est pas une molécule inerte puisque son action est comparable à celle de l'E.D.T.A. Les dosages ont même permis de montrer que la quantité de cations chélatée par la pénicillamine dans les germes est supérieure à celle chélatée par l'E.D.T.A., ce qui provoque un appauvrissement des germes en Ca^{++} et Mg^{++}.

Ceci était très important à démontrer puisqu'il est connu que la rigidité de la paroi et la perméabilité bactérienne sont dépendantes de la concentration en cations divalents. Les modifications d'activités enzymatiques enregistrées chez les germes traités à la pénicillamine sont probablement dues à une désorganisation des structures membranaires.

Il est d'autre part remarquable d'observer que des quantités de pénicillamine aussi faibles que 25 µg par ml ont une action très prononcée sur les activités physiologiques étudiées, car elles sont apparemment incapables de provoquer des désordres morphologiques importants. Or, 25 µg par ml sont des concentrations souvent observées in vivo lors de l'hydrolyse enzymatique des pénicillines par les entérobactéries. Il avait d'ailleurs été déjà observé que ces quantités de pénicillamine étaient suffisantes pour inhiber la pigmentation de *Pseudomonas aeruginosa*. Il est connu que la pigmentation contient de nombreuses fonctions sulfhydryles libres et que la cystéine les transforme en leucodérivés. La pénicillamine doit agir d'une manière analogue.

Donc la pénicillamine, peut par ses fonctions très réactives intervenir dans de nombreux phénomènes métaboliques. Au cours de l'étude de l'activité pénicillinasique d'*Escherichia coli*, il a été montré que la perméabilité cellulaire était perturbée par la pénicillamine et par de faibles quantités de benzylpénicilline. Or, l'effet obtenu lors de l'association de ces deux produits était fortement amplifié. Pouvons-nous montrer que la pénicillamine jouerait un rôle important dans l'antibiose des pénicillines ?

---°---

Chapitre III

POTENTIALISATION DES PENICILLINES PAR LA PENICILLAMINE

Il a été observé dans le chapitre précédent que la pénicillamine potentialise les modifications de la perméabilité bactérienne d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 provoquées par la benzylpénicilline. Est-ce que la pénicillamine ne potentialiserait pas l'action antibiotique des pénicillines naturelles et semi-synthétiques ?

Un travail très systématique de SCHERR et BECHTLE (208) portant sur l'action de divers amino acides avec la benzylpénicilline a révélé que 1.000 µg par ml de D pénicillamine potentialise l'action antibiotique de la Pénicilline G sur*Staphylococcus aureus* 209 P et *Sarcina lutea* ATCC 9341.

Deux investigations sont à faire :

- l'action potentialisatrice de la pénicillamine se manifeste-t-elle sur les germes à Gram -, comme sur les germes à Gram + ?
- l'action potentialisatrice de la pénicillamine ne se produit-elle qu'en présence de benzylpénicilline?

C'est ce que nous allons étudier dans ce chapitre.

1. MATERIEL ET METHODES.

A. LES SOUCHES.

Nous avons utilisé les mêmes souches à Gram + que SCHERR et BECHTLE.

- Sarcina lutea ATCC 9341
- Staphylococcus 209 P

et deux souches d'entérobactéries étudiées dans la première partie de travail.

- *Escherichia coli* K_{12} C_{6}^{oo} λ-
- *Escherichia coli* O_{111} B_{4}^{oo} n°3.

L'inoculum est de 300.000 germes par ml, provenant d'une culture de 18 heures à 37°C en milieu Penassay Difco.

B. LES PENICILLINES.

Les pénicillines utilisées sont la benzylpénicilline, l'ampicilline, le 6 APA, l'oxacilline et la diméthoxy pénicilline.

C. LA PENICILLAMINE.

C'est la pénicillamine purifiée extraite des hydrolysats chlorhydriques d'une solution de 6 APA qui a été utilisée.

D. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE.

Différentes méthodes ont été utilisées :

1. Méthode des gradients en gélose utilisée par SCHEER et BECHTLE.

Des boîtes de Pétri carrées de 9 x 9 cm sont utilisées. Deux couches de gélose, constituées chacune par 12,5 ml de Milieu Penassay n°2 seront coulées séparément. La couche inférieure est coulée lorsque la boîte est inclinée, la couche supérieure, contenant la pénicilline, lorsque la boîte est remise à plat. La surface de la gélose est recouverte par 3,5 ml du même milieu ensemencé par 0,3 ml de l'inoculum.

Une bande de papier Whatman n°1 de 1 x 7 cm qui a été immergée dans une solution de pénicillamine de 1.000 µg par ml, puis séchée à plat à l'étuve à 37°C est déposée sur la gélose ensemencée de façon à couvrir tous les gradients de pénicilline.

Les boîtes sont incubées 18 heures à 30°C lorsqu'elles sont ensemencées avec Sarcina lutea et à 37°C dans tous les autres cas.

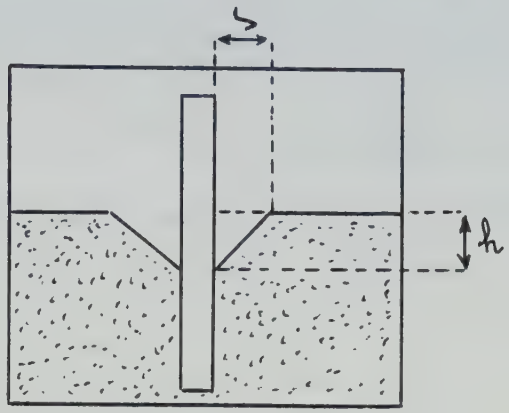
Les solutions d'antibiotiques sont préparées dans de l'eau bidistillée stérile de façon à obtenir par ml de gélose, les concentrations suivantes exprimées en µ g par ml.

Sarcina lutea :6 APA : 500, Ampicilline : 0,06, Méthicilline : 0,5, Oxacilline : 0,5, Pénicilline G : 0,02.

Staphylococcus aureus 209 P : 6 APA : 300, Ampicilline : 0,5, Méthicilline : 5, Oxacilline : 0,5, Pénicilline G : 0,05.

Escherichia coli K_{12} : 6 APA : 300, Ampicilline : 10, Méthicilline : 200, Oxacilline : 50, Pénicilline G : 100.

Ces auteurs expriment les synergies en calculant le rapport $\frac{h}{v}$, les valeurs h et v exprimées en mm sont mesurées comme l'indique le schéma suivant :



2. Méthode des papiers croisés de CHABBERT :

Des bandes de papier Whatman n°1 sont imprégnées selon le protocole opératoire précédemment décrit avec 0,3 ml d'une solution aqueuse de pénicilline à 1.000 µg par ml ou 0,3 ml d'une solution aqueuse de pénicillamine à 1.000 µg par ml. Elles sont séchées, puis déposées perpendiculairement dans le coin d'une boîte de Pétri contenant une couche de gélose Pénassay 2 et une deuxième couche contenant le même inoculum que ci-dessus.

3. Méthode des dilutions sériées en tubes :

Dans deux séries de 14 tubes, des dilutions géométriques de pénicilline, de raison 2 sont faites en milieu Penassay, ensemencées par 300.000 germes par ml. Les concentrations maxima de pénicilline sont de 1.000 µg par ml pour les entérobactéries et de 1 µg par ml pour les germes Gram+. Dans une série de tubes, 100 µg par ml de pénicillamine sont ajoutés.

La même expérience est faite en milieu Penassay saccharosé à 20 pour cent.

On a déterminé après 18 heures de culture à 30 ou 37°C selon les germes :

- la C.M.I. dans chaque série de tubes,
- la DO de chaque tube au spectrophotomètre Unicam SP 600 à λ 670 m µ .

et étudié la morphologie bactérienne au microscope à contraste de phase dans chaque tube où la culture est apparente.

4. Enregistrement des DO au biophotomètre.

Dans les mêmes conditions opératoires, nous avons pu, par cette méthode, apprécier l'action du 6 APA et de la pénicillamine sur la croissance bactérienne. Les mesures ont été faites au biophotomètre enregistreur Bonet Maury et Jouan (1.520).

E. NUMERATION DES SURVIVANTS.

1. Numération optique : elle est effectuée à l'aide de cellules de Malassez.

2. Numération de cellules viables : le milieu utilisé est le milieu gélosé Penassay 2. La suspension de germes ou de sphéroplastes est diluée convenablement dans de l'eau bidistillée : 0,1 ml de la dernière dilution est introduit dans 25 ml de gélose maintenue à 40°C, puis après homogénéisation, le tout est coulé en boîte de Pétri.

II. RESULTATS.

En utilisant la méthode des gradients de pénicilline, nous avons dans un premier temps vérifié les observations de SCHEER et BECHTLE. Dans un deuxième temps nous avons élargi leur méthode en introduisant dans la gélose des pénicillines autres que la benzylpénicilline.

A. METHODE DES GRADIENTS DE PENICILLINE EN GELOSE.

Nous avons utilisé les mêmes quantités de pénicilline que les auteurs, mais des quantités moindres de pénicillamine, puisque la bande de papier ne contient que 0,3 à 0,5 ml d'une solution à 1.000 µ g par ml.

Comme les auteurs, nous avons chiffré la synergie en mesurant le rapport $\frac{h}{v}$. Ainsi nous avons vérifié que des quantités de pénicillamine inférieures à 1.000 µg par ml potentialisaient l'action antibiotique de la Pénicilline G sur *Sarcina lutea* et *Staphylococcus aureus*.Les résultats sont les suivants.

Sarcina lutea ATCC 9341 : S 10/5
Staphylococcus aureus 209 P : S 5/7

En utilisant la même méthode et les mêmes souches, il a été facile d'observer que la pénicillamine potentialisait l'action antibiotique de l'ampicilline comme celle de la benzylpénicilline (Clichés 22 et 23).

Les résultats sont les suivants :

Sarcina lutea ATCC 9341 : S 10/12
Staphylococcus aureus 209 P : S 8/14

La potentialisation serait même plus accentuée avec l'ampicilline qu'avec la Pénicilline G.

La pénicillamine potentialise de même l'action du 6 APA. Les résultats sont les suivants :

Sarcian lutea ATCC 9341 : S 10/15
Staphylococcus aureus 209 P : S 5/15

Avec les autres pénicillines, c'est-à-dire avec l'oxacilline et la diméthoxy pénicilline, les résultats obtenus sont moins nets et des pousses secondaires empêchent une lecture rigoureuse des constantes h et v.

Avec les entérobactéries, l'étude de la potentialisation de la pénicillamine sur toutes des pénicillines ne peut être faite par cette méthode. Les constantes sont de lecture très difficile. Aussi d'autres méthodes ont été utilisées. Celles des papiers croisés de Chabbert a donné des résultats intéressants avec une souche de colibacille.

B. METHODE DES PAPIERS CROISES DE CHABBERT.

Avec cette méthode, l'action de la pénicillamine avec la Pénicilline G et l'ampicilline est très nette sur la souche *Escherichia coli* K_{12} C_{600} .(cliché 22 et 23).

Si nous chiffrons la synergie comme précédemment, nous trouvons que l'association Pénicilline G-pénicillamine donne un rapport :

$\frac{h}{v}$ = S 7/6 celle d'ampicilline-pénicillamine de S 8/8.

Mais ces deux méthodes en gélose sont très approximatives et le choix de méthodes beaucoup plus précises et rigoureuses a été indispensable.

C. METHODE DES DILUTIONS SERIEES EN TUBE : MESURE DES C.M.I. APRES 18 HEURES DE CULTURE.

Nous allons donner les résultats enregistrés avec 3 souches, les deux colibacilles étudiés se comportant de façon comparable. Ce seront *Sarcina lutea, Staphylococcus aureus et Echerichia coli* K_{12} C_{600}.

1- Sarcina lutea.

Par la méthode des gradients en gélose, il a été observé que la souche était particulièrement sensible à l'action antibiotique de la benzylpénicilline, de l'ampicilline et du 6 APA en présence de pénicillamine.

Par la méthode des dilutions sériées, il a été constaté que dans la galerie de tubes contenant la pénicillamine, avec les 5 pénicillines étudiées, en milieu isotonique comme en milieu hypertonique, dans tous les cas la C.M.I. est déplacée de 2, sinon de 4 ou 5 tubes en faveur d'une synergie.

Tous les résultats sont inscrits dans le tableau 38. Par exemple avec la benzylpénicilline en milieu isotonique, la pénicillamine déplace la C.M.I. de 0,006 à 0,00035 µg/ml.

Avec l'ampicilline, la C.M.I. passe de 0,00075 à 0,0004 µg/ml.

En milieu hypertonique la pénicillamine provoque la même action avec la même intensité.

Sarcina lutea	*Milieu Penassay*	*Milieu Penassay saccharosé à 20 %*
Pénicilline G	0,006	0,012
Pénicilline G + D Pénicillamine	0,00035	0,000011
Ampicilline	0,00075	0,003
Ampicilline + D Pénicillamine	0,0004	0,0004
6 APA	50	25
6 APA + D Pénicillamine	12,5	7,25
Méthicilline	0,0725	0,125
Méthicilline + D pénicillamine	0,0182	0,0006
Oxacilline	3,2	2
Oxacilline + D Pénicillamine	1,6	0,4

Tableau 38 - Sarcina lutea - détermination des C.M.I. en milieu Penassay normo ou hypertonique de diverses pénicillines avec ou sans D.pénicillamine.

Les C.M.I. sont exprimées en µg par ml de pénicilline.

Les quantités de pénicillamine sont de 100 µg par ml.

2- Staphylococcus aureus.

L'action de la pénicillamine est moins nette sur la pousse du staphylocoque que sur celle de la sarcine. Apparemment elle ne modifie l'activité antibiotique que de la benzylpénicilline et de l'oxacilline. Le tableau 39 présente les résultats. (voir tableau 39 page suivante).

Staphylocoque 209 P	*Penassay*	*Penassay saccharosé à 20 %*
Pénicilline G	0,025	0,05
Pénicilline G + Pénicillamine	C,0125	0,025
Oxacilline	0,25	0,5
Oxacilline + Pénicillamine	0,03	0,08

Tableau 39 - Staphylococcus aureus 209 P. Détermination des C.M.I. en milieu Penassay normo ou hypertonique de diverses pénicillines avec ou sans D pénicillamine.
Les C.M.I. sont exprimées en µ g par ml de pénicilline..
Les quantités de pénicillamine sont de 100 µg par ml.

En milieu normotonique la C.M.I. de la benzylpénicilline est déplacée par la pénicillamine de 0,025 à 0,0125 µ g par ml et celle de l'oxacilline de 0,25 à 0,03 µ g par ml.

La pénicillamine ne déplace les C.M.I. de l'ampicilline, du 6 APA et de la diméthoxypénicilline, ni en milieu normotonique, ni en milieu hypertonique.

Cette méthode paraît aussi peu précise que celle des gradients en gélose puisqu'elle ne permet pas de retrouver l'action synergique de la pénicillamine avec le 6 APA et l'ampicilline.

Ceci va être confirmé par les résultats obtenus avec la souche d'*Escherichia coli* K_{12}.

3/ Escherichia coli K_{12}.

Les C.M.I. de benzylpénicilline et d'ampicilline capables d'inhiber la pousse d'*Escherichia coli* K_{12} sont déplacées par la pénicillamine en milieu isotonique et hypertonique.

Les C.M.I. de l'oxacilline, de la diméthoxy pénicilline et du 6 APA ne sont pas modifiées. Les résultats sont présentés dans le tableau 40. En milieu normotonique, il apparaît que la pénicillamine déplace la C.M.I. de la benzylpénicilline de 50 à 12,5 µg par ml et de l'ampicilline de 0,855 à 0,214 µg par ml (voir tableau 40 page suivante).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par la méthode de CHABBERT.

Des résultats beaucoup plus intéressants ont été obtenus lorsque nous avons enregistré au spectrophotomètre Unicam SP 500 à λ = 670 m la DO de chaque tube où un trouble était apparent.

Escherichia coli K 12	*Penassay*	*Penassay saccharosé à 20 %*
Benzylpénicilline	50	50
Benzylpénicilline + pénicillamine	12,5	12,5
Ampicilline	0,855	1,75
Ampicilline + pénicillamine	0,214	0,428

Tableau 40 - Escherichia coli K12. Détermination des C.M.I. en milieu Penassay normo ou hypertonique de diverses pénicillines en présence ou en l'absence de pénicillamine.

Les C.M.I. sont exprimées en µ g par ml de pénicilline.

Les quantités de pénicillamine sont de 100 µg par ml.

D. METHODES DES DILUTIONS SERIEES EN TUBE : MESURE DES DENSITES OPTIQUES DE CHAQUE TUBE APRES 18 HEURES DE CULTURE.

Les DO enregistrées ont permis d'observer que l'action de la pénicillamine était variable selon les conditions de la culture et la souche étudiée. Ceci nous permet de classer les résultats en 3 catégories

1°. action favorable,
2°. action variable,
3°. indifférence apparente.

1°. Potentialisation de l'activité antibiotique des pénicillines par la pénicillamine.

La mesure des DO montre que si la pénicillamine ne déplace pas toujours la C.M.I. des pénicillines, elle est capable de diminuer fortement la pousse bactérienne en présence de très faibles quantités de pénicilline. Voici les résultats obtenus avec les diverses souches étudiées.

a) Sarcina lutea.

En milieu normotonique comme en milieu hypertonique, la pénicillamine déplace toutes les C.M.I. des cinq pénicillines étudiées. La mesure des DO permet d'introduire un paramètre supplémentaire à l'étude précédente. En effet, en présence de pénicilline, il est notable qu'entre le dernier tube où la pousse est apparente et le premier tube limpide, la

DO passe brutalement d'une valeur assez élevée à une valeur nulle. Au contraire, en présence de pénicilline et de pénicillamine, la DO décroît très progressivement dans les tubes contenant des concentrations de pénicilline inférieures à la C.M.I. Le phénomène est observable dans le cas des 5 associations étudiées et il est indépendant de la tonicité du milieu. La figure 20 a avec l'oxacilline illustre le phénomène.

b) Staphylococcus aureus.

Il a été observé que selon les méthodes utilisées, la potentialisation de l'activité antibiotique des diverses pénicillines par la pénicillamine était variable avec ce germe selon la nature de la pénicilline.

La méthode plus précise des mesures des DO à permis d'unifier les divers résultats. En effet, l'action de la pénicillamine est moins nette sur l'activité des pénicillines sur le staphylocoque que sur la sarcine, mais elle est réelle quelle que soit la pénicilline et la tonicité du milieu. Le tableau 41 donnant les résultats obtenus avec l'association ampicilline - pénicillamine, montre que pour des concentrations d'ampicilline très inférieures à celles de la C.M.I., les valeurs des DO demeurent faibles longtemps. L'association pénicilline - pénicillamine inhibe partiellement la pousse du staphylocoque comme celle de la sarcine jusqu'à des valeurs infrabactériostatiques de pénicilline. Le tableau 42 avec la méthicilline le confirme.

Concentrations d'ampicilline ou mg/ml	*MILIEU HYPERTONIQUE*		*MILIEU NORMOTONIQUE*	
	Ampicilline seule	*Ampicilline + Pénicilline*	*Ampicilline seule*	*Ampicilline + Pénicillamine*
0,2	35	0	0	0
0,1	40	9	5	-
0,05	44	21	45	29
0,025	55	33	49	36
0,0125	60	33	50	42
0,0075	60	46	49	41
0,0037	61	40	50	45

Tableau 41 - Mesure par DO de la croissance du staphylocoque 209 P en présence d'ampicilline et de 100 mg/ml de pénicillamine milieu Penassay normo et hypertonique.

Contentrations de méthicilline en mg/ml	MILIEU HYPERTONIQUE		MILIEU NORMOTONIQUE	
	Méthicilline seule	Méthicilline + Pénicillamine	Méthicilline seule	Méthicilline + Pénicillamine
1	22	4	29	12
0,50	38	12	68	30
0,25	47	19	58	54
0,125	48	29		
0,0725	48	30		
0,036	64	37		

Tableau 42 - Mesure par DO de la croissance du staphylocoque 209 P en présence de méthicilline et 100 mg/ml de pénicillamine.

Milieu Penassay normo et hypertonique.

c) Escherichia coli K_{12}.

L'étude de deux pénicillines seulement va être présentée : ce sont la Pénicilline G et l'ampicilline. Il a déjà été noté que :

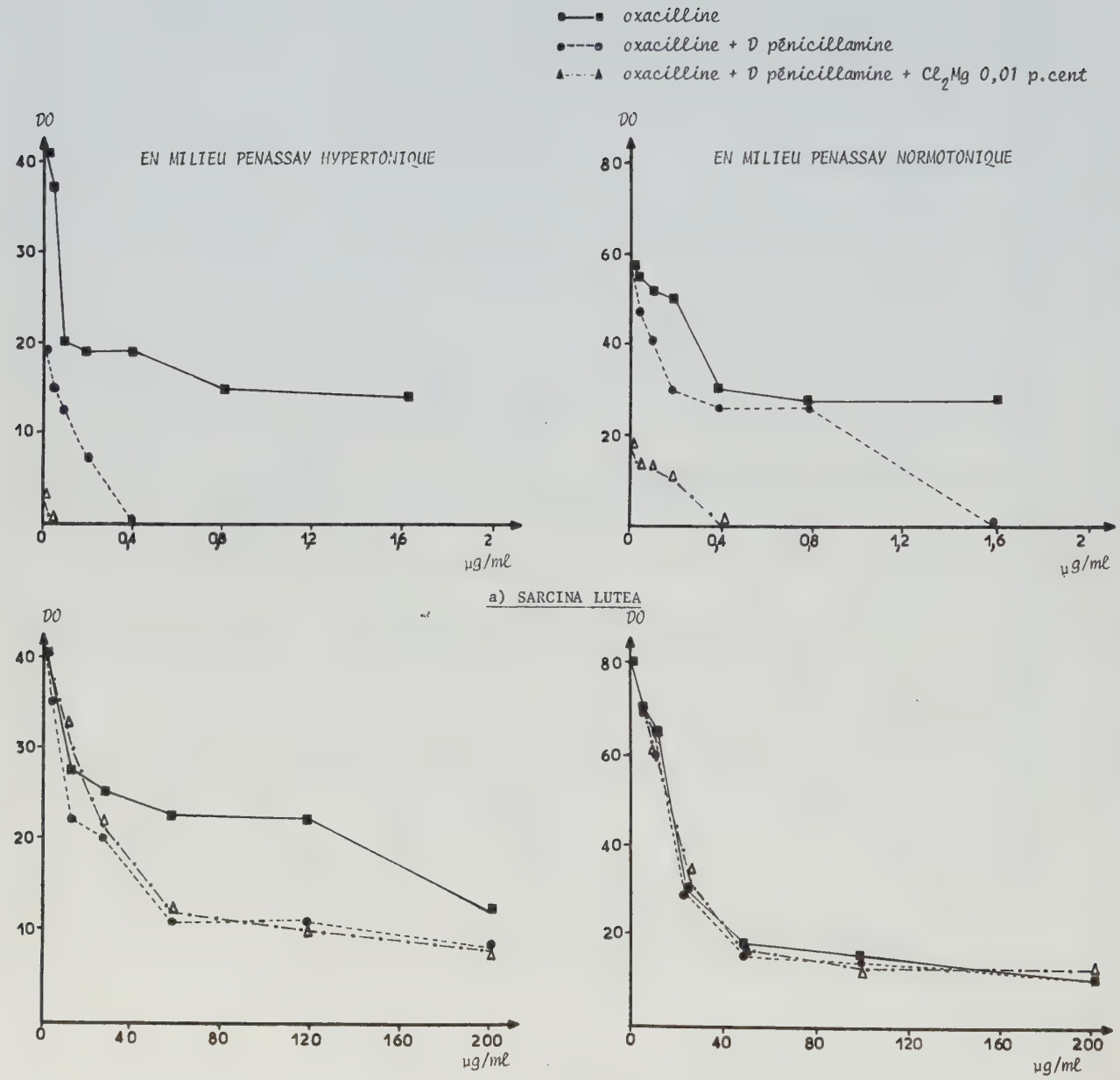
- la pénicillamine déplace la C.M.I. des deux pénicillines en faveur d'une synergie. Les figures 20 b - c,en milieu normo et hypertonique montrent que en deçà de la C.M.I., la pénicillamine abaisse fortement les DO des cultures de colibacilles, comme dans les cas précédents.

Donc nous pouvons affirmer que dans tous les cas d'associations étudiés jusqu'à présent, la pénicillamine intervient dans l'antibiose en amplifiant l'action bactériostatique ou bactéricide des pénicillines. Or, l'étude en microscopie photonique en contraste de phase de la morphologie des germes se développant en présence de quantités infrabactériostatiques de pénicilline, en présence ou non de pénicillamine, montre que celle-ci est fortement modifiée.Donc la mesure des DO est une résultante globale qui n'est pas le reflet de l'importance de la population microbienne.

Dans le tableau 43, nous avons résumé la diversité de la morphologie observée en milieu isotonique et en milieu hypertonique, en présence de quantités de pénicilline inférieures à la C.M.I. Il apparaît qu'en présence de pénicillamine, les formes sphéroplastiques sont beaucoup plus nombreuses. D'autre part, un fait nous paraît particulièrement digne d'intérêt,c'est la présence et le nombre de ghosts très importants observables dans les deux premiers tubes en dessous de la C.M.I. La pénicillamine semble favoriser nettement l'activité lytique de la pénicilline.

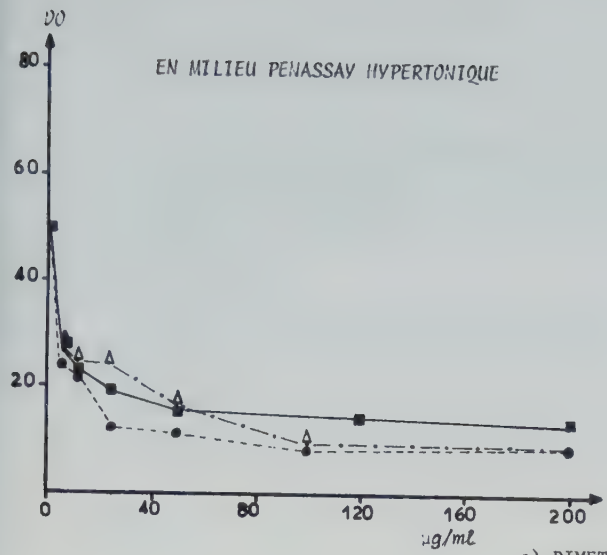
K_{12}	*Benzylpénicilline en bouillon Penassay*	*Benzylpénicilline - pénicillamine en bouillon Penassay*
100 µg	pas de pousse	pas de pousse
25 µg	germes mobiles	débris - ghosts
6,25 g	filaments	sphéroplastes gros et vacuolisés, quelques oreilles de lapin, quelques germes mobile
1,55µg	germes mobiles quelques filaments agglutinés	sphéroplastes petits et denses, quelques formes mobiles.
0,39µg	rares filaments, germes mobiles	- " -
0,08µg	germes mobiles	petits sphéroplastes denses, quelques formes longues, quelques filaments
K_{12}	*en bouillon Penassay saccharosé à 20 %*	*en bouillon Penassay saccharosé à 20 %*
100 µg	-	-
25 µg	filaments portant de nombreux renflements	nombreux ghosts, sphéroplastes petits et denses
6,25µg	germes trapus avec rares filaments	sphéroplastes moyens sphéroplastes petits et denses
1,55µg	rares filaments germes mobiles	sphéroplastes denses, formes longues, germes trapus
0,39µg	- " -	beaux sphéroplastes vacuolisés
0,08µg	germes mobiles, quelques uns trapus	beaux sphéroplastes, présence de filaments renflés

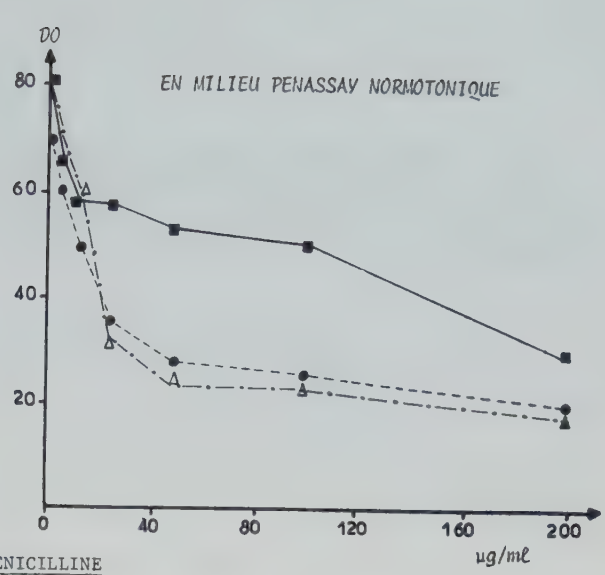
Tableau 43 - Polymorphisme des germes traités à la benzylpénicilline en présence ou en l'absence de 100 µg/ml de pénicillamine.



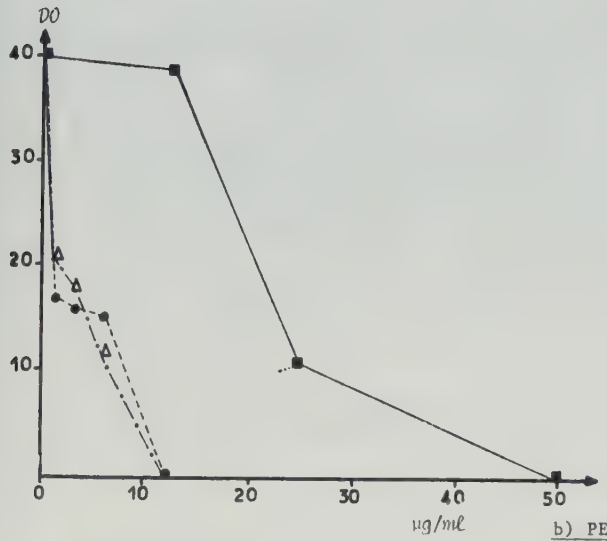
POTENTIALISATION DES PENICILLINES PAR LA PENICILLAMINE - OXACILLINE
MILIEU PENASSAY

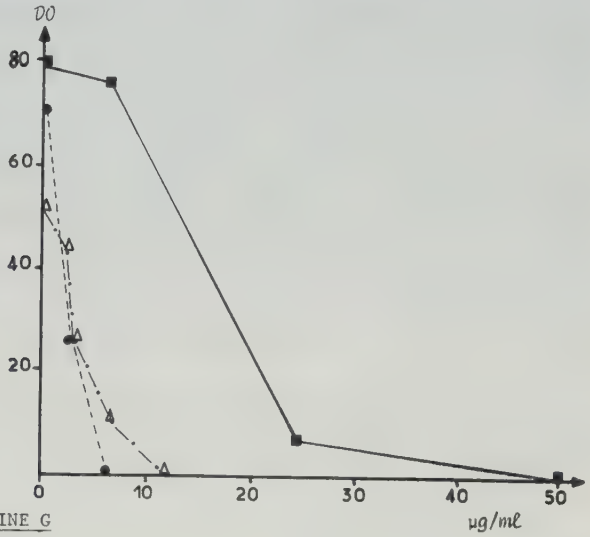
FIGURE 20



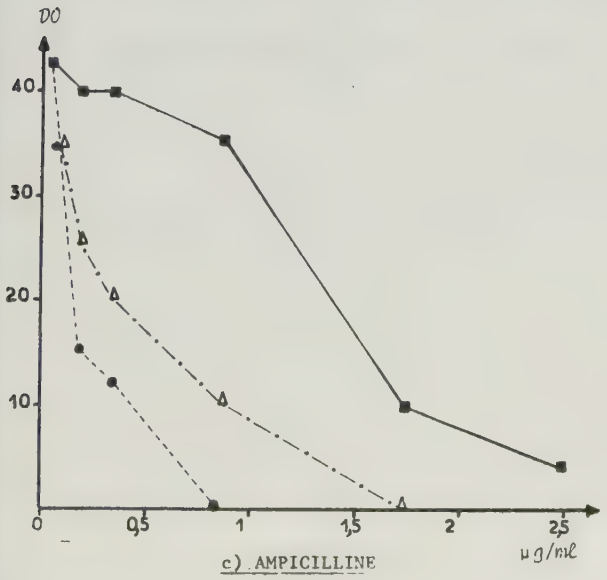


a) DIMETHOXY PENICILLINE





b) PENICILLINE G



c) AMPICILLINE

●——● Pénicilline

●—·—● Pénicilline + Pénicillamine

△—·—△ Pénicilline + Pénicillamine + CL_2Mg 0,01 p.cent

POTENTIALISATION DES PENICILLINES PAR LA PENICILLAMINE
E. COLI K_{12} - MILIEU PENASSAY

FIGURE 21

Cependant, dans ce paragraphe, nous n'avons pas pu classer toutes les associations étudiées. Il est des cas où la pénicillamine semble avoir un effet moins net ou même nul. Nous allons les envisager maintenant.

2 - *Potentialisation de l'activité antibiotique des pénicillines par la pénicillamine en fonction de la tonicité du milieu.*

Ce phénomène a été observé avec la souche *Escherichia coli* K_{12} en étudiant l'action de la pénicillamine sur l'activité antibiotique de la méthicilline et de l'oxacilline.

a) l'oxacilline.

La figure 20 a montrait nettement que la pénicillamine potentialisait l'action de l'oxacilline sur la pousse de *Sarcina lutea* plus efficacement en milieu hypertonique, qu'en milieu isotonique.

La figure 20 b, montre qu'elle a un effet comparable sur la pousse d'*Escherichia coli* K12 . Mais dans ces conditions opératoires, la pénicillamine n'a aucune action sur l'activité antibiotique de l'oxacilline en milieu Penassay. Les deux tracés 1 et 2 sont superposés. Au contraire, en milieu hypertonique, la pénicillamine augmente l'activité de la pénicilline dans les zones de concentration de 7 à 200 µg/ml.

b) la méthicilline.

Avec la méthicilline et la souche de colibacille, le phénomène inverse est observé. En milieu isotonique, l'effet de la pénicillamine est net, il est nul en milieu hypertonique (figure 21 a).

Donc, la tonicité du milieu semble influencer le degré de potentialisation par la pénicillamine de l'activité antibiotique des pénicillines sur la souche d'entérobactérie étudiée.

3 - *La pénicillamine semble sans effet sur l'activité antibiotique du 6 APA.*

Avec toutes les méthodes utilisées précédemment, la pénicillamine semble sans aucun effet sur l'activité du 6 APA sur la pousse des colibacilles. Or, un fait a retenu notre attention : les tracés des DO lues donnent des courbes irrégulières dues à une succession de valeurs faibles et de valeurs élevées, car la morphologie des germes est variables en fonction de la concentration du 6 APA. En particulier en présence de pénicillamine et de 6 APA, il y a formation à côté de véritables sphéroplastes gros et vacuolisés, de formes monstrueuses et filamenteuses qui peuvent être très longues et atteindre 10 µ . Ces formes ne sont pas comparables à celles induites par le 6 APA. Leur étude détaillée sera poursuivie ultérieurement. Mais ceci permet d'expliquer les résultats précédents. Pour définir la relation qui existe entre la DO et le nombre de germes, deux méthodes sont utilisées.

1 - La recherche du taux d'N_2 total après minéralisation du culot de centrifugation par la méthode de FALS et VEATLE, les résultats étant ramenés au mg de poids sec de bactéries. La méthode apprécie seulement la croissance bactérienne sans différencier les formes vivantes des ghosts.

2 - La recherche du nombre de survivants par dilution et comptage des colonies en gélose. La méthode permet d'apprécier le nombre de formes viables et,par rapport à un témoin sans antibiotique, de définir l'activité antibiotique totale.

La deuxième méthode a été utilisée pour étudier l'association 6 APA - pénicillamine sur *Escherichia coli* K_{12} et O_{111} B_4 , les deux colibacilles se comportant de la même façon.

En premier lieu, la numération des germes à la cellule Malassez a donné les résultats suivants.

En milieu isotonique *Escherichia coli* O_{111} B $_4$ cultivé 18 heures à 37°C en milieu Penassay contient 2,8 x 10^6 germes par ml. En présence de 30 µg par ml de 6 APA, la densité microbienne devient égale à 1,3 x 10^6 germes par ml. En présence de 30 µg par ml de 6 APAet de 100 µg par ml de pénicillamine, la densité est de 0,5 x 10^6 germes par ml.

En milieu hypertonique, le témoin contient 2 x 10^6 germes par ml. La présence de 30 µg par ml de 6 APA abaisse le nombre de germes à 0,6 x 10^6 par ml et celle de 30 µg par ml de 6 APA et de 100 µ g par ml de pénicillamine à 0,35 x 10^6 germes par ml.

Donc dans les deux cas, la densité microbienne est diminuée de près de 50 pour cent par la pénicillamine. Des dilutions en gélose ont été effectuées pour vérifier la vitalité des germes (cliché 26).

Le premier tube avant la C.M.I. où la pousse est apparente contenant 40 µg par ml de 6 APA par ml est porté à la dilution 10^{-7}. 0,1 ml de la dilution est introduit dans 25 ml de gélose Penassay (boîte 1) La même dilution est faite à partir du tube qui contient 40 µg par ml de 6 APA et 100 µg par ml de pénicillamine. Une seconde gélose est ensemencée avec la dilution (boîte 2). Après 18 heures d'incubation, 168 colonies sont comptables dans la boîte 1, 7 seulement dans la boîte 2.

Après 18 heures de culture, la pénicillamine a potentialisé l'action antibiotique du 6 APA sur la pousse du colibacille.

L'étude de cette association a été poursuivie au biophotomètre pour étudier le phénomène dans les premières heures de culture, c'est-à-dire pour étudier l'action de la pénicillamine sur la croissance bactérienne.

E. ENREGISTREMENT DE LA CROISSANCE BACTERIENNE AU BIOPHOTOMETRE.

Les courbes obtenues avec *Escherichia coli* O_{111} B_4 mis en présence de diverses quantités de 6 APA et de 6 APA + Pénicillamine vont être étudiées.

1 - Courbe d'enregistrement n° 1.

Toutes les cuves contiennent 10 ml de milieu Penassay ensemencé par 300.000 germes par ml.

- Cuve n°1 = témoin, sans antibiotique.

- Cuves n° 2, 3, 4 = contiennent respectivement 25, 30 et 35µg par ml de 6 APA.

- Cuve n° 5 contient 25 µg par ml de 6 APA + 100 µg par ml de pénicillamine.

- Cuve n° 6 contient 30 µg par ml de 6 APA + 100 µg par ml de pénicillamine.

Le tracé obtenu montre que le 6 APA seul, en fonction des concentrations, augmente le temps de latence de la pousse du colibacille et modifie la vitesse de croissance, donc les temps de génération. Si la pénicillamine était sans action, la courbe 2 devrait être superposable à la courbe 5, la courbe 3 à la courbe 6.Or la pénicillamine en présence de certaines concentrations de 6 APA augmente l'action antibiotique de cette pénicilline.

Le tableau 44 donne les résultats numériques, il apparaît que la pénicillamine modifie :

- le temps de latence qui passe de 7 h 30 à 18 heures
  et de 21 h à 28 heures.

- le temps de génération, c'est-à-dire la durée d'une bipartition de
  31 mn à 86 mn et de
  81 mn à 100 mn.

Il paraît évident que la pénicillamine ralentit la croissance bactérienne d'*Escherichia coli*.

Si nous comparons les résultats précédents, il apparaît que 100 µg par ml de pénicillamine ajoutée à :

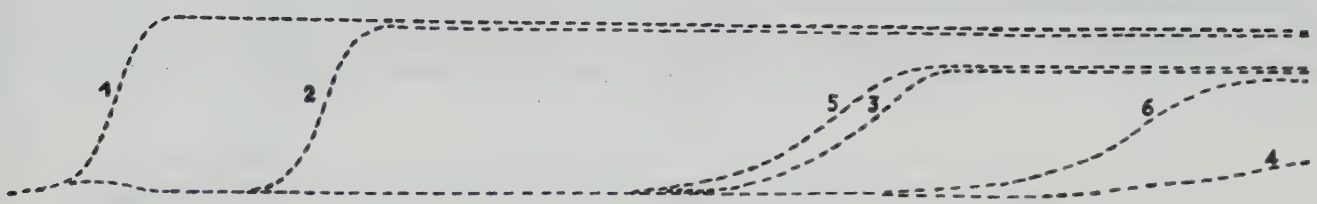
20 µg par ml de 6 APA augmentent le temps de latence de 3 h 30
25 µg par ml " " " " " " " 10 h 30
30 µg par ml " " " " " " " 7 h

La comparaison des différents T.M.G. donne les résultats suivants :

100 µg par ml de pénicillamine ajoutée à :

25 µg par ml de 6 APA augmentent le T.M.G. de 55 mn
30 µg par ml " " " " " 19 mn

E. COLI $O_{111}B_4$ - MILIEU BPG



COURBE D'ENREGISTREMENT n° 1

1 = témoin germes
2 = 20 µg/ml de 6 APA
3 = 30 µg/ml de 6 APA
4 = 40 µg/ml de 6 APA
5 = 20 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine
6 = 30 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine

Courbes	*6 APA*	*Pénicillamine*	*Latence*	*Pousse moyenne*	*Temps de génération*
1	-	-	1 h 30	5 h	19mn 20sec
2	25	-	7 h 30	11 h	31 mn
3	30	-	21 h	28 h	81 mn
4	35	-	33 h	44 h	131 mn
5	25	100	18 h	28 h	86 mn
6	30	100	28 h	37 h	100 mn

Tableau 44 - Résultat de la courbe d'enregistrement n°1 Escherichia coli O_{111} B_4 - Milieu Penassay - concentrations variable de 6 APA et de pénicillamine.

Il semble donc que la pénicillamine potentialiserait avec plus d'intensité l'action antibiotique de quelques concentrations de 6 APA. . En considérant l'étroitesse du phénomène de zone, nous avons voulu poursuivre l'expérimentation. 3 courbes sont intéressantes à détailler.

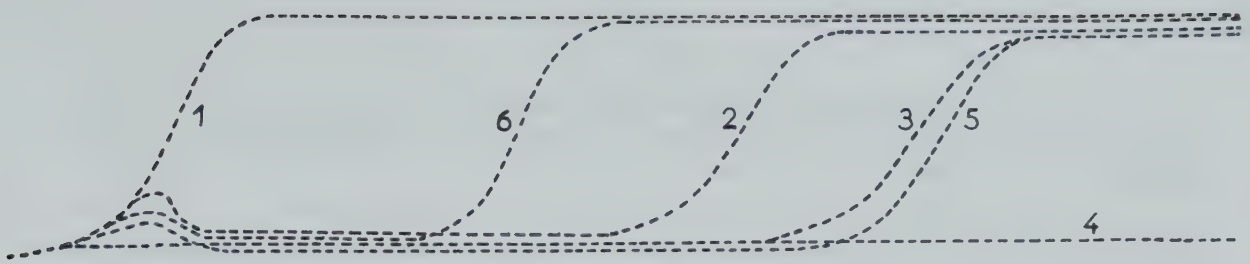
- *la courbe d'enregistrement n°2* exécutée dans les mêmes conditions opératoires rigoureuses montre que le phénomène est bien reproductible, même si la zone d'activité est légèrement décalée. Il apparaît en effet que 30 µg par ml de 6 APA ne sont pas potentialisés par la pénicillamine, alors que 25 µg par ml le sont nettement.

- *la courbe d'enregistrement n°3* étudie le rôle de la pénicillamine sur deux quantités différentes de 6 APA : 20 et 40 µg par ml.

En présence de 20 µg par ml de 6 APA, la pénicillamine allonge peu le temps de latence et le temps de génération : les tracés 2 et 4 sont presque superposés, le tracé accusant tardivement une diminution secondaire de la pousse.

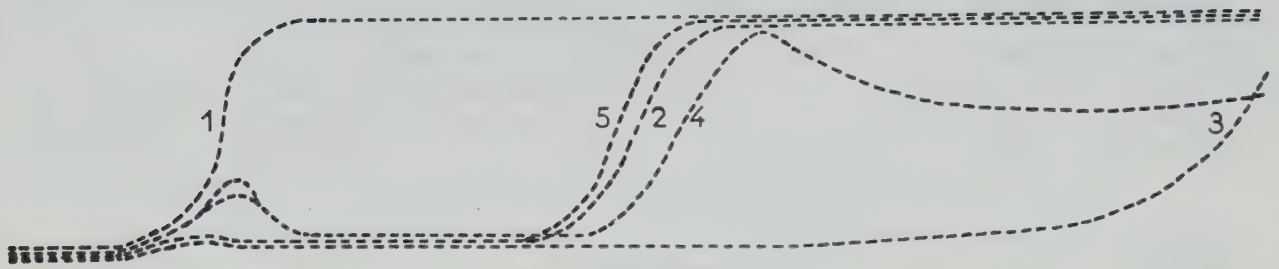
En présence de 40 µg par ml de 6 APA, la pénicillamine diminue le temps de latence. Celui du tracé 5 est de 10 heures, celui du tracé 3 est de 20 heures. Le T.M.G est aussi perturbé : il passe de 85 mn à 23 mn c'est-à-dire qu'il est pour ainsi dire ramené à la normale qui est de 19 mn 20 sec.

Il semble donc qu'associée à des concentrations plus élevées de 6 APA, la pénicillamine soit non seulement incapable de potentialiser l'action de l'antibiotique, mais encore elle la diminuerait.



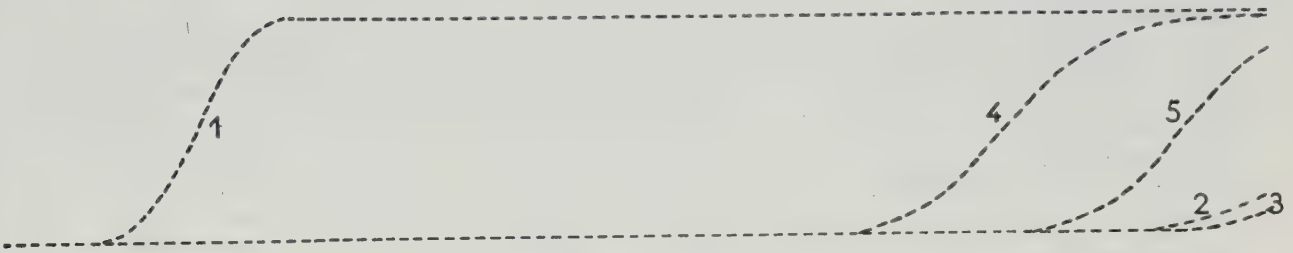
COURBE D'ENREGISTREMENT n° 2

1 = témoin germes
2 = 25 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine
5 = 30 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine
3 = 40 µg/ml de 6 APA
6 = 25 µg/ml de 6 APA
4 = 30 µg/ml de 6 APA



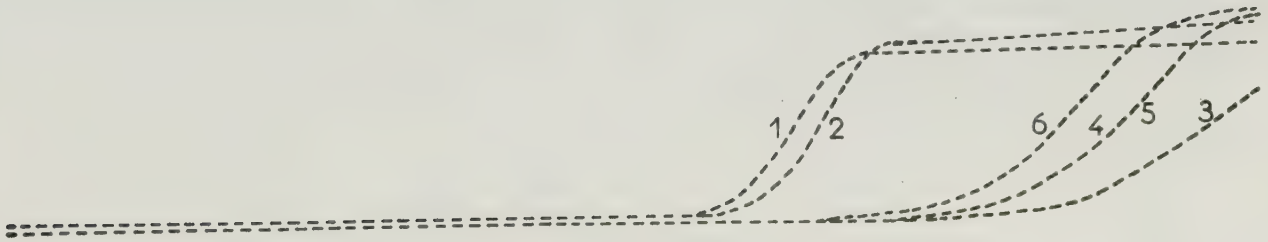
COURBE D'ENREGISTREMENT n° 3

1 = témoin germes
2 = 20 µg/ml de 6 APA
3 = 40 µg/ml de 6 APA
4 = 20 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine
5 = 40 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine



COURBE D'ENREGISTREMENT n° 4

1 = témoin germes
4 = 25 µg/ml de 6 APA
3 = 30 µg/ml de 6 APA
2 = 25 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine
5 = 30 µg/ml de 6 APA + 100 µg/ml de pénicillamine



COURBE D'ENREGISTREMENT n° 5

1 = 30 µg/ml de 6 APA
2 = 30 µg/ml de 6 APA + 200 µg/ml de pénicillamine
3 = 30 µg/ml " " + 100 µg/ml " "
4 = 30 µg/ml de 6 APA + 50 µg/ml de pénicillamine
5 = 30 µg/ml " " + 25 µg/ml " "
6 = 30 µg/ml " " + 12,5 µg/ml " "

- *la courbe d'enregistrement n°4* montre que le phénomène est réel puisque reproductible. Les tracés 1 et 2 accusent une potentialisation, les tracés 3 et 5 une diminution d'activité antibiotique.

Un véritable phénomène de zone semble exister, lié à la concentration de la substance antibiotique. La concentration de pénicillamine a-t-elle autant d'importance que celle de 6 APA ?

- *courbe d'enregistrement n°5.*

La quantité fixe de 6 APA est de 25 µg par ml.

la cuve	1	contient	du 6 APA		
la "	2	"	"	"	+ 200 µg par ml de pénicillamine
" "	3	"	"	"	+ 100 µg par ml de pénicillamine
" "	4	"	"	"	+ 50 µg par ml de pénicillamine
" "	5	"	"	"	+ 25 µg par ml de pénicillamine
" "	6	"	"	"	+ 12 µg par ml de pénicillamine

Les tracés montrent que la quantité de pénicillamine qui provoque la potentialisation la plus importante en intensité est 100 µg par ml. 200µg par ml potentialisent moins le 6 APA ainsi que 25 et 12,5 µg par ml. Il est remarquable cependant que des quantités de pénicillamine aussi petites que 12,5 µg par ml aient encore un effet notable sur le temps de latence et le temps de génération d'*Escherichia coli* en présence de 25µg par ml de 6 APA. Ces faibles concentrations sont parfois dosées dans les milieux de culture étudiés dans la première partie de ce travail.

En conclusion , en association avec la pénicilline, la pénicillamine ne se comporte jamais comme une molécule inerte. Son action potentialisatrice sur l'activité antibiotique des pénicillines est beaucoup plus accentuée sur les germes à Gram + que sur les germes à Gram -, cet effet semblant variable en fonction des souches et des pénicillines. D'autre part, il a été essentiel de montrer que la pénicillamine agit en présence de 6 APA sur la croissance bactérienne, dès les premières heures de culture. Ceci nous permet de penser que la pénicillamine pourrait,tout au moins en présence de pénicilline,intervenir dans le métabolisme microbien, donc agir comme un véritable antibiotique, en bloquant une ou plusieurs activités enzymatiques. Or, le fait que la potentialisation ne se produise parfois que dans une zone très étroite de concentration de pénicilline, permet de penser que la pénétration in vivo de la pénicillamine est très dépendante d'une modification métabolique du germe provoquée par une certaine quantité de pénicilline.

L'étude de la potentialisation par la pénicillamine a été complétée par la recherche de l'influence des ions Ca^{++} et Mg^{++} qui jouent un rôle complexe et important dans l'intégrité de la paroi, donc peut être dans la pénétration des substances antibiotiques.

F. INCLUENCE DES IONS Ca^{++} et Mg^{++} SUR LA POTENTIALISATION DES PENICILLINES PAR LA PENICILLAMINE.

L'étude a été faite en mesurant au spectrophotomètre la DO des tubes contenant la pénicilline, la pénicillamine et 0,1 pour cent de Cl_2 Mg, les tubes étant ensemencés et incubés selon le protocole opératoire précédemment décrit.

L'action du Mg^{++} peut être présentée de la manière suivante .

1°. Le Mg^{++} ne modifie pas l'activité antibiotique de l'association pénicilline - pénicillamine.

La potentialisation par la pénicillamine de l'activité de la benzylpénicilline sur la pousse d'*Escherichia coli* n'est pas perturbée par la présence de Mg^{++}, quelle que soit la tonicité, comme le confirme la figure21 b. Il en est de même de celle de l'oxacilline sur la même souche en milieu hypertonique (20 b) et de la diméthoxypénicilline en milieu isotonique. (21 a).

En détaillant la courbe de la figure 21 b, on peut observer cependant l'apparition d'un phénomène de zone. En présence de 6,3 et 1,5 µg par ml de benzylpénicilline et de 100 µg par ml de pénicillamine, le Mg^{++} ne modifie pas l'activité antibiotique observée en l'absence du cation . Si les concentrations de pénicilline sont supérieures, le Mg^{++} les diminue, si elles sont inférieures, il les augmente.

Il semble qu'un phénomène de zone puisse être délimité dans chaque expérimentation. Les concentrations des diverses substances ont donc une importance capitale pour observer le phénomène de potentialisation.

2°. Le Mg^{++} potentialise l'activité antibiotique de l'association pénicilline - pénicillamine.

La figure 20 a,montre que 2,8 µg par ml d'oxacilline sont capables en milieu Penassay hypertonique d'inhiber la pousse de la sarcine. Si à la même quantité d'oxacilline, on ajoute 100 µg par ml de pénicillamine,la C.M.I.est égale à 0,4 µg par ml en l'absence de Mg^{++} et égale à 0,03 µg par ml en présence du cation.

Il faut donc conclure que 0,1 pour cent de Cl_2 Mg est capable de modifier l'activité antibiotique des associations pénicilline - pénicillamine d'une manière variable selon les germes et les pénicillines étudiées. Il a été vérifié que l'action antibiotique de la pénicilline n'est modifiée en aucune façon par les cations divalents, La Mg^{++} n'agirait donc que sur l'association ou sur la pénicillamine seule.

3°. Le Mg^{++} peut diminuer l'activité antibiotique de l'association pénicilline - pénicillamine.

La figure 21c, représentant l'activité antibiotique de l'ampicilline sur *Escherichia coli* montre que la C.M.I. de l'ampicilline en

présence de pénicillamine seule est de 0,8 µg par ml et en présence de pénicillamine et de Mg^{++} elle est de 1,75 µg par ml. L'action est semblable pour des concentrations supérieures d'ampicilline. Mais on n'observe jamais une inhibition totale de l'action de la pénicillamine par le Mg^{++}. L'activité chélatrice de la pénicillamine n'est sans doute pas seule à intervenir dans le métabolisme microbien.

4°. Le Ca^{++} et le Mg^{++} modifient différemment l'activité antibiotique de l'association pénicilline G - pénicillamine sur le Staphylocoque 209 P.

Le tableau 45 présente les valeurs des DO obtenus par enregistrement au spectrophotomètre après 18 heures de culture. Il est frappant qu'en présence de 0,1 pour cent de Cl_2Ca, il apparaît en milieu isotonique comme en milieu hypertonique, un véritable phénomène de zone. Aux concentrations de pénicilline G égales à 0,05 et 0,02 µg par ml, le Ca^{++} fait régresser l'action potentialisatrice de la pénicillamine et même diminue l'activité antibiotique propre de la pénicilline. Aux concentrations égales à 0,125 et 0,0062 µg par ml, le Ca^{++} ne modifie guère la potentialisation de la pénicillamine, alors qu'à la concentration inférieure on observe une croissance anormale de germes.

Le Mg^{++} ne donne pas le même phénomène, il accentue l'activité antibiotique de l'association étudiée.

Ainsi l'effet des cations bivalents dans l'expérimentation précédente semble difficile à définir. Nous aurions voulu observer que dans la plupart des cas, l'addition de cations comme le Ca^{++} et le Mg^{++} pouvait neutraliser l'action de la pénicillamine, soit en restituant à la bactérie les cations disparus, soit en agissant sur la pénicillamine elle-même. En fait, il semble que les concentrations de pénicilline, de pénicillamine et de cations ont une influence essentielle sur le phénomène de potentialisation qui ne peut se manifester que dans des zones étroites et déterminées.

III. CONCLUSION .

Le phénomène de potentialisation de la pénicilline par la pénicillamine a été décrit deux fois dans la littérature. En dehors des travaux systématiques de SCHERR et BECHTLE, il faut signaler ceux des Laboratoires Lilly. La cystéine inhibe l'action antibiotique de la pénicilline. Aussi , étudiant le rôle des dérivés soufrés, les auteurs ont noté que la pénicillamine,à l'inverse de tous les autres dérivés voisins, potentialisait l'action de l'antibiotique sur le Staphylocoque 209 P. Leurs résultats sont particulièrement intéressants , puisqu'ils montrent que la pénicillamine n'est active que pour des concentrations déterminées de pénicilline, ce qui évoque un phénomène de zone. Ceci est confirmé par nos résultats. En outre, elle inhibe la pousse secondaire lors de la croissance bactérienne. Donc la pénicillamine peut jouer

µg/ml de Pénicil line	Pénicilline G seule	Pénicilline G + Pénicillamine	PénicillineG + Ca^{++} Pénicillamine	Pénicilline G + Mg^{++} Pénicillamine
Milieu isotonique				
0,05 µg	0	0	37,5	0
0,02 µg	13	0	39	0
0,0125µg	13	4	0	0
0,0062µg	15	4	0	4
0,0031µg	18	6	34	4
0,0015µg	27	48	19	52
0,0007µg	22	75	27,5	82
Milieu hypertonique				
0,05 µg	0	0	23	0
0,02 µg	0	0	25	0
0,0125µg	0	0	0	0
0,0062µg	15	3	0	0
0,0031µg	19	16	29	17,5
0,0015µg	25	19	44	21
0,0007µg	39	54	36	61

Tableau 45 - Mesure des DO de culture de 18 heures de staphylococcus aureus 209 P. La quantité de pénicillamine est dans chaque tube de 100 µg par ml. Les quantités de pénicilline sont variables. Le Mg^{++} et le Ca^{++} sont ajoutés sous forme de 0,1 % de Cl_2Mg et 0,1 % de Cl_2 Ca.

un rôle essentiel dans l'antibiose des pénicillines, toute l'étude reposant sur une"action extérieure"de la pénicillamine. Mais il a été possible de montrer que dans tous les cas, la pénicillamine potentialise l'activité antibiotique des pénicillines avec plus ou moins d'intensité selon les germes et la nature de la pénicilline. Ce qui fut le plus difficile à définir, ce fut le rôle des cations divalents. Il semble paradoxal qu'un excès de Ca^{++} et de Mg^{++} dans le milieu puisse amplifier l'action potentialisatrice de la pénicillamine. Si la pénicillamine intervient dans le métabolisme microbien par sa fonction chélatrice, on aurait dû observer dans tous les cas une réversion du phénomène. En fait, les résultats obtenus permettent d'envisager un mécanisme complexe qui peut en fonction des conditions opératoires et de la sensibilité des souches, osciller soit vers une potentialisation, soit vers une réversion. Les germes à Gram + paraissent beaucoup plus sensibles au phénomène que ceux à Gram -. Or, c'est le mucocomplexe de Park qui est particulièrement avide de cations libres. La pénicillamine agirait-elle essentiellement à ce niveau ?

---°---

MESURE DE POTENTIALISATION DES PENICILLINES PAR LA PENICILLAMINE

RECHERCHE DE L'ACTIVITE DE LA COMBINAISON DU CHLORURE DE PENICILLAMINE ET DU 6 APA

*
* *

I - METHODE DE SCHEER ET BECHTLE.

La bande de papier buvard placée au centre de la boîte de Pétri a été immergée dans une solution de 1.000 µg par ml de pénicillamine (hydrolysat acide de 6 APA).

CLICHE 22 - *Sarcina lutea* - ampicilline 0,01 µg par ml.

CLICHE 23 - *Staphylococcus aureus* 209 P - ampicilline 0,13 µg par ml.

II - METHODE DES PAPIERS CROISES.

La bande de papier placée horizontalement a été imprégnée de pénicillamine comme précédemment.

CLICHE 24 - La bande placée verticalement a été immergée dans une solution de 1.000µg par ml de pénicilline G.

CLICHE 25 - Elle l'a été dans une solution de 1.000 µg par ml d'ampicilline.

III - NUMERATION DES SURVIVANTS.

E. coli O_{111} B_4 n° 3

6 APA 30 µg par ml

D pénicillamine 100 µg par ml

Cl_2Mg 0,1 %

Culture de 18 heures en milieu B.P.G. portée à la dilution 10^{-7}.

CLICHE 26 - 1 : culture en présence de 6 APA.

2 : culture en présence de 6 APA et de pénicillamine.

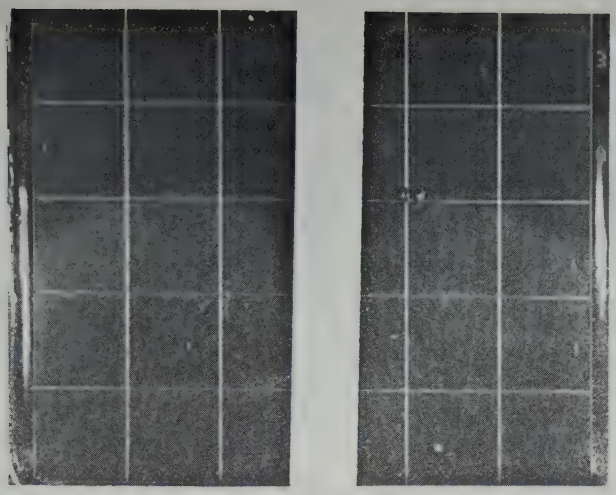
3 : culture en présence de 6 APA et de pénicillamine et de Cl_2Mg .

IV - RECHERCHE DE L'ACTIVITE DE LA COMBINAISON DU CHLORURE DE PENICILLAMINE ET DU 6 APA.

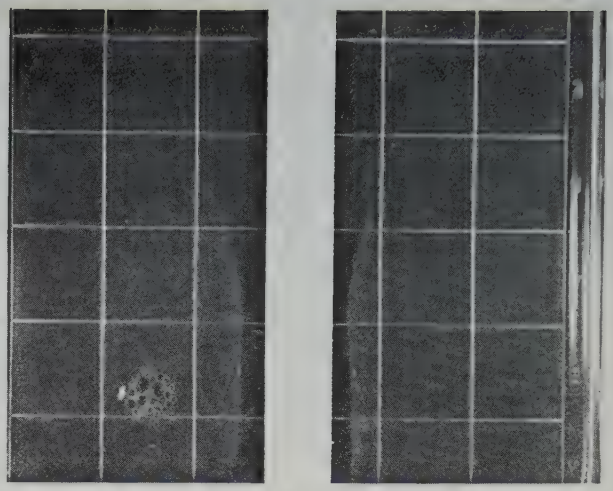
CLICHE 27 - *haut* : témoin de 6 APA aux concentrations suivantes : de gauche à droite : 500, 250, 100 et 1.000 µg par ml.

milieu : chlorure de pénicillamine.

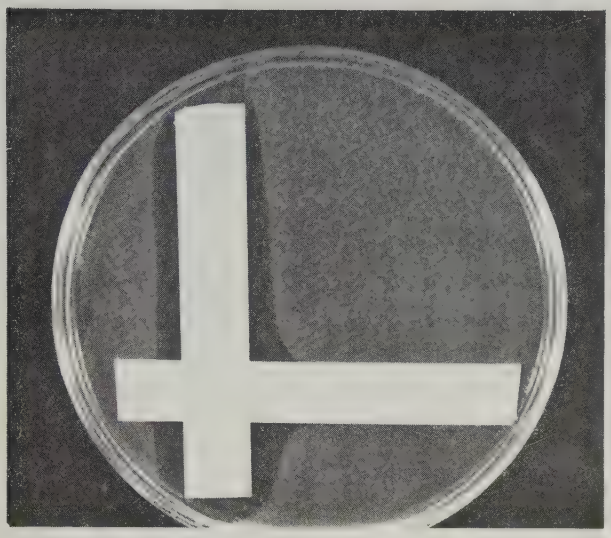
bas : produit synthétisé par pulvérisation du Chlorure de pénicillamine sur 500, 250, 100 et 1.000 µg par ml de 6 APA.



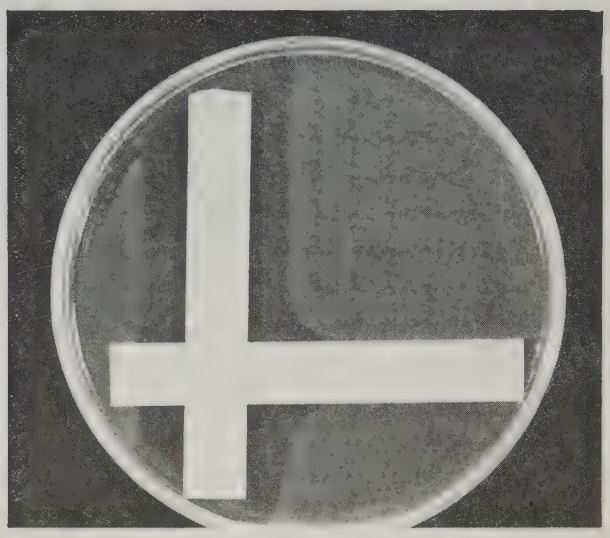
22



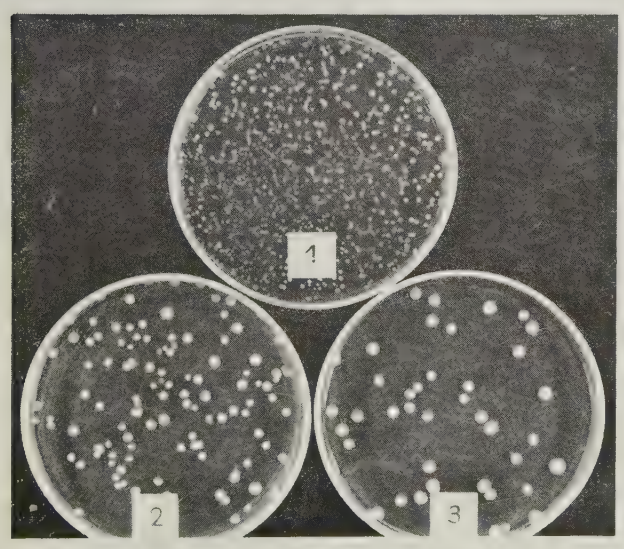
23



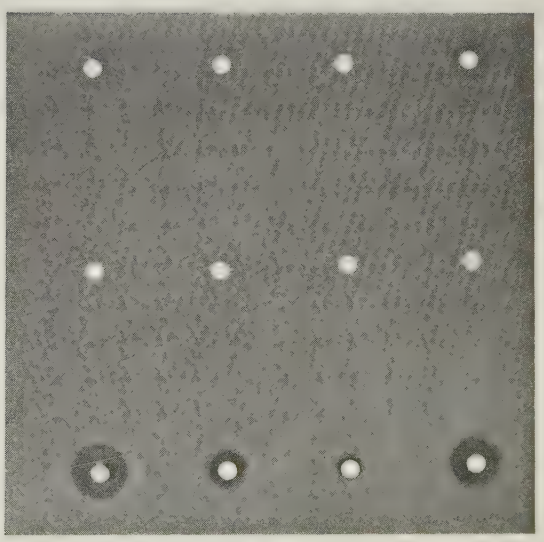
24



25



26



27

RESUME ET CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Il a été montré essentiellement au cours de cette deuxième partie que la pénicillamine utilisée à des concentrations telles que 100 µ g par ml était responsable de nombreux désordres tant morphologiques que métaboliques. La pénicillamine capable de provoquer ces effets est obtenue par hydrolyse chimique du 6 APA. Pour être active , elle doit être soigneusement purifiée par chromatographie sur des grains de Florisil et utilisée très rapidement. Or, nous avons pu montrer que la pénicillamine extraite des milieux de culture provenant de la dégradation de la benzylpénicilline, par les entérobactéries, provoquait un effet semblable. Deux différences étaient cependant notables. En premier lieu, la pénicillamine d'origine bactérienne était au moins cinq fois plus active que la pénicillamine d'origine chimique ; en deuxième lieu, elle possède aux concentrations les plus élevées, un effet lytique que ne possède en aucun cas l'autre pénicillamine.

Donc l'étude faite avec la pénicillamine d'origine chimique n'est qu'une approche des perturbations réelles que peut entraîner la présence de la pénicillamine d'origine bactérienne, d'autant plus que cette dernière est de formation endogène. Nous nous sommes donc, dans cette expérimentation, probablement heurtée à un phénomène supplémentaire qui était la pénétration de la molécule de pénicillamine à l'intérieur de la bactérie. Elle nous a cependant permis d'observer qu'en présence de pénicilline, la pénicillamine modifiait fortement la perméabilité cellulaire, pénétrait probablement plus facilement dans la bactérie, ce qui entraînait une très nette potentialisation de l'activité antibiotique. Le phénomène est particulièrement accusé chez les germes à Gram +, plus faible chez les colibacilles. Ceci permet de conclure que si la pénicillamine n'a pas une activité antibiotique propre, elle possède une activité antimétabolique qui peut-être plus ou moins spécifique.

Aussi, l'étude de l'action chélatrice de la pénicillamine sur les ions Ca^{++} et Mg^{++} nous paraît tout particulièrement intéressante. Elle permet d'envisager une activité antimétabolique puisque *in vivo*, la pénicillamine se comporte comme l'EDTA. Or, les effets de l'EDTA sur les germes ont été très étudiés par des auteurs comme REPASKE (185) (186), ASBELL et EAGON (10) (11) et LEIVE (132) (133). Nous allons les résumer

très brièvement et nous les comparerons aux effets provoqués par la pénicillamine.

Selon les auteurs, l'étude de la modification de la perméabilité bactérienne par l'EDTA a été abordée de deux manières différentes. Certains ont étudié la pénétration d'une substance après modification de la paroi. Il est admis que les métabolites ionisés, s'ils n'ont pas de système spécifique de transport,ne pénètrent pas dans les germes. Tel serait le cas de l'actinomycine. *Escherichia coli* est résistant à cet antibiotique car la molécule ne pénétrant pas dans l'organisme ne peut pas modifier la synthèse de l'A.R.N. Or, LEIVE (132) a montré, qu'après traitement à l'EDTA, la souche de colibacille devient sensible à l'actinomycine. La perméabilité de la paroi a donc été modifiée par l'EDTA. Ainsi,dans l'expérimentation précédente, la pénicillamine peut, dans un premier temps, altérer la perméabilité et,dans un deuxième temps, pénétrer dans la bactérie.

D'autres auteurs comme J.M.T. HAMILTON MILLER (97) ont montré que le traitement de deux souches de klebsielles par 1 µ mole d'EDTA augmente considérablement leur activité pénicillinasique. Comme les pénicillinases des klebsielles sont endo-cellulaires, l'auteur en conclut que l'EDTA modifie fortement la perméabilité cellulaire. Or, en traitant les germes par la pénicillamine, il nous a été possible de montrer que l'activité des endopénicillinases d'entérobactéries augmentait de près de 50 pour cent et que celle des β galactosidases était fortement modifiées . Nous pouvons donc en conclure que, comme l'EDTA , la pénicillamine modifie la perméabilité cellulaire.

HAROLD (102) admet que la perte immédiate de la perméabilité aux petites molécules reflète non pas une désintégration de la membrane, mais une désorganisation structurale qui modifie plus ou moins sont efficacité. Or de nombreux auteurs comme SALTON (201), WEIDEL, FRANCK ET MARTIN (255), NOLLER et HARTSELL (163) considèrent que l'EDTA désorganise une des couches,probablement la couche lipoprotidique,qui recouvre le substrat mucopeptidique de la paroi. L'effet de l'EDTA en tampon tris sur *Escherichia coli* a été très étudié par LEIVE (1965-1968). Ces substances modifient l'intégrité anatomique d'*Escherichia coli* après un traitement de 2 mn. Leur action prolongée provoque une large élimination de la fraction lipopoly-saccharidique du cell-wall. Le mucocomplexe de Park est alors superficiel ce qui explique que les cellules sont devenues sensibles à l'action de l'actinomycine comme des germes à Gram + et à celle du lysozyme. Ce "pelage" des germes a été étudié en miscoscopie électronique par BIRDSELL et COTAROBLES (22) (42). CARSON et EAGON (30) ont montré que l'EDTA provoque la même libération des lipopolysaccharides de la paroi chez *Pseudomonas aeruginosa* ce qui entraîne l'apparition de formes osmotiquement sensibles.

Il a été observé dans ce travail que la pénicillamine induisait aussi des formes anormales, très sensibles aux variations osmotiques. La paroi bactérienne des entérobactéries et du *Pseudomonas* est altérée par

endroits, décollés après hypertrophie des membranes, et certains sphéroplastes sont presque uniquement limités par la membrane cytoplasmique. Donc un rapprochement entre l'action de l'EDTA et de la pénicillamine est motivé.

En outre, dès 1956, REPASKE (185) (186) suggère que l'EDTA devait se combiner avec les ions métalliques liés au cell-wall. L'hypothèse reposait sur l'observation suivante : une résine Dowex 50 (H^+) échangeuse de cations sensibilisait les germes à Gram - à l'action du lysozyme tout comme l'EDTA. Au niveau de la paroi bactérienne, les cations divalents pourraient servir à lier les lipopolysaccharides aux autres composants (112) ou préviendraient leur libération en inhibant l'action d'enzymes autolytiques présentes dans le cell-wall. Les ions Ca^{++} et Mg^{++} ont été détectés en 1965 dans le lipide A de la paroi d'*Escherichia coli* (29). En 1967, LEIVE (133) a voulu vérifier l'action de l'EDTA sur les cations en faisant réverser le phénomène par addition d'un large excès de cations. Dix pour cent seulement des bactéries ont été restaurées et ont récupéré une perméabilité correcte. Tout au long de ce travail, nous nous sommes heurtée au même problème. L'addition de fortes quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} n'a pas toujours été capable de neutraliser l'action de la pénicillamine. Parfois même, elle était capable de potentialiser son action. En fait, de très nombreux phénomènes secondaires, dépendant probablement de la répartition des charges ioniques à la surface des germes,doivent interférer.

C'est en 1966 que ASBELL et EAGON (11) ont montré que la perte de la rigidité de la paroi était due à un remplacement des ions Ca^{++} et Mg^{++} par des ions Na^+ . Les dosages des quantités de Ca^{++} et de Mg^{++} présents dans les germes traités à la pénicillamine ont révélé une perte globale en cations de l'ordre de 50 pour cent.

L'EDTA et la pénicillamine ont donc une action chélatrice très comparable sur les cations de la paroi bactérienne, ce qui entraîne de fortes modifications de la perméabilité bactérienne des germes ainsi traités.

Les ions Ca^{++} et Mg^{++} ne sont pas uniquement présents dans la paroi et la membrane cytoplasmique. Comme la pénicillamine a été mise en évidence à l'intérieur des germes, elle peut exercer son action sur les ions localisés dans la bactérie . D'après de nombreux auteurs, le Mg^{++} semble surtout jouer un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire. WEBB (153) (154), LUSK, WILLIAMS et KENNEDY (140) ont montré que le Ca^{++} ne pouvait remplacer le Mg^{++} en tant que facteur de croissance essentiel. De nombreux auteurs ont mis en évidence que le Mg^{++} était indispensable à la pousse des germes. HURWITZ et ROSANA (113) et TEMPEST et STRANGE (238) ont déterminé les concentrations minima de Mg^{++} indispensables à la culture d'*Escherichia coli*. Plus importante est l'étude des auteurs comme TEMPEST et coll. (236) (237) et Mac CARTHY (144) qui ont noté que, en l'absence de Mg^{++} , la synthèse de l'ARN était fortement perturbée. Il y aurait en particulier perte des ribosomes 70 S et 100 S et,après 24 heures de culture,5 pour cent des ribosomes originaux

seulement persisteraient. Les ribosomes sont dégradés et réduits en petits molécules d'une manière irréversible. HURWITZ et ROSANA (113) ont pu démontrer que le Mg^{++} était indispensable à la stabilité des ribosomes d'*Escherichia coli*, du RNA transfert et des hélices d'acides polyuridiliques et polyadényliques ; le Mg^{++} serait d'ailleurs fixé au ribosome puisque après dialyse 2/3 du Mg y demeure solidement attaché. D'après FELSENFELD (69) le Mg^{++} neutraliserait aussi la charge de l'ion PO_4^{---}, ce qui stabiliserait la structure secondaire des acides nucléiques (231) (233).

Ces observations nous paraissent très importantes parce que, d'après nos résultats, la pénicillamine carence le germe beaucoup plus en Mg^{++}, qu'en Ca^{++} et la structure ribosomale des sphéroplastes pénicillamine semble altérée.

En conclusion, il apparaît que la pénicillamine, quelle que soit sa provenance, soit capable d'altérer très profondément non seulement la morphologie mais encore l'intégrité membranaire des bactéries, la stabilité des ribosomes et probablement les activités enzymatiques où l'ions Mg^{++} est indispensable.

---°---

SYNTHESE ET DISCUSSION

---°---

Un grand nombre de faits ont été observés tout au long de ce travail. Il a été essentiellement montré que la pénicillamine pouvait être un métabolite produit au cours de l'hydrolyse des pénicillines par les entérobactéries, le pyocyanique et le staphylocoque doré, et qu'elle était capable de perturber la morphologie et la physiologie des germes à Gram négatif .

I. SYNTHESE DES RESULTATS.

Au cours de l'induction des sphéroplastes pénicilline d'*Escherichia coli* O_{111} B_4 n°3 , J. LATRILLE (129 - 156) avait mis en évidence la présence de pénicillamine dans les milieux de culture. Partant de ce fait, nous avons observé que la production du métabolite par le germe dépend du pH, du rH et surtout de la tonicité et de la composition du milieu, la teneur en cations divalents étant particulièrement importante.

La production de pénicillamine est toujours tardive, mais le délai d'apparition ainsi que la quantité produite sont dépendants du nombre de germes, comme de la quantité de pénicilline introduite. Il semble donc,que le colibacille dégrade spécifiquement la benzylpénicilline en pénicillamine.

Elargissant l'étude, nous avons cherché à déterminer si ce mode de dégradation de la Pénicilline G était particulier au colibacille O_{111} B_4 . Dix souches d'entérobactéries ont été étudiées (trois colibacilles, quatre salmonelles, un citrobacter et deux klebsielles) ainsi que deux pyocyaniques et un staphylocoque doré. Toutes les souches étudiées, sauf *Pseudomonas aeruginosa n°100*, sont capables de dégrader la benzylpénicilline en pénicillamine en milieu hypertonique. En milieu isotonique, les résultats sont variables selon les germes.

Comme la production de pénicillamine est proportionnelle au nombre de germes, nous avons pensé qu'elle est plus prononcée en milieu hypertonique qu'en milieu normotonique parce que le nombre de survivants est supérieur. En fait, si ce paramètre intervient, il n'est sûrement pas le seul car il n'existe aucun rapport entre la sensibilité de la souche à la pénicilline et la production de pénicillamine. Des souches comme *Klebsiella 418* et *Staphylococcus aureus* qui sont particulièrement résistantes à la benzylpénicilline ne produisent jamais de pénicillamine en milieu normotonique.

Il a été recherché s'il existait une relation entre la production de pénicillamine et la présence d'une β lactamase ou d'une acylase. Toutes les souches choisies possèdent une β lactamase sauf deux salmonelles, *S.*Ty_2 et *S. typhi murium* N°101. Elles sont toutes dépourvues

d'acylase sauf les colibacilles O_{111} B_4 et Normaflore n°20. Il a été observé qu'en l'absence d'acylase comme de β lactamase, il pouvait y avoir production de pénicillamine. Donc,la production est indépendante de la présence d'acide pénicilloïque et de 6 APA dans les milieux de culture. Cependant,la formation précoce d'acide pénicilloïque peut accroître la production. Des souches commes les Klebsielles n°5 et 418 et le staphylocoque doré posséoant les plus fortes activités β lactamasiques produisent les plus grandes quantités de pénicillamine. En fait, les quantités de pénicillamine produites, bien que très dépendantes du nombre de germes et de la quantité de substrat sont très variables selon les souches.

Différents substrats ont été proposés aux souches étudiées d'une part diverses pénicillines et d'autre part leurs dérivés pénicilloïques. Il a été noté que les quantités de pénicillamine produites sont variables en fonction de la nature des pénicillines introduites sans que l'on puisse en conclure que des pénicillines stables à pH acide, résistantes ou sensibles aux βlactamases soient de meilleurs substrats que les autres. Il semble seulement que la présence de la chaîne latérale soit primordiale puisque le 6 APA est rarement dégradé en pénicillamine..

Ainsi, quels que soient la pénicilline proposée et l'équipement enzymatique connu de la souche, les résultats ne sont pas identiques et varient même pour une souche donnée en fonction de la tonicité du milieu. Ceci évoque l'existence de substrat préférentiel et d'activité propre à la souche, ce qui nous a amené à penser que la production de pénicillamine pouvait être sous dépendance enzymatique. Pour étayer cette hypothèse, il a été prouvé que dans les milieux témoins sans germes, dans ceux ensemencés avec des germes tués par la chaleur ou conservés à + 4°C, il n'y avait jamais production de pénicillamine. Donc,la formation du métabolite est bien le résultat d'une hydrolyse bactérienne. Elle est même étroitement liée au métabolisme microbien puisque le rendement de la production est supérieur de 85 pour cent si les germes sont en croissance active et non au repos . Il a été montré d'autre part que la production de pénicillamine pouvait être induite non seulement par la pénicilline mais encore par l'acide pénicilloïque. Cette production est totalement inhibée par le chloramphénicol. Cet ensemble d'arguments est très en faveur du fait qu'une activité enzymatique serait responsable de la production de pénicillamine.

En dernier lieu, il a été montré que les phénomènes observés n'étaient pas le reflet exact de la réalité. En traitant les cultures par les utrasons, il a été observé une nette augmentation de la quantité de pénicillamine. Ceci a permis de penser que la formation de la pénicillamine était endogène. Le même procédé a permis de provoquer l'apparition du métabolite dès les premières heures de culture. Donc la pénicillamine est formée précocement dans les germes et n'est libérée que secondairement, probablement par lyse microbienne.

La pénicillamine pourrait-elle être responsable de la lyse ou tout au moins y participer ? C'est la question que nous nous sommes posée. Aussi, toute la deuxième partie du travail a été consacrée à l'action spécifique de la molécule de pénicillamine sur la morphologie et la physiologie bactérienne.

L'étude a été faite avec de la pénicillamine obtenue par hydrolyse chimique du 6 APA soigneusement purifiée. Cette substance, utilisée à des concentrations telles que 100 µ g par ml, est responsable de nombreux désordres morphologiques et physiologiques. Elle modifie la rigidité de la paroi, provoquant l'apparition de formes bactériennes anormales et même parfois de véritables protoplastes limités presque uniquement par leur membrane cytoplasmique . La perméabilité cellulaire est modifiée, ce qui a été prouvé par l'étude des variations de l'activité d'endoenzymes comme la β lactamase ou la β galactosidase d'*Escherichia coli*. La pénicillamine provoque ce désordre très certainement comme l'E.D.T.A. puisque le métabolisme des cations divalents est fortement perturbé.

Il s'est révélé que l'étude faite avec la pénicillamine d'origine chimique n'est qu'une lointaine approche des perturbations réelles que peut entraîner la présence de pénicillamine endogène formée lors de l'antibiose. Il a été observé que la pénicillamine d'origine enzymatique est beaucoup plus active que celle d'origine chimique ; des concentrations trois fois plus faibles induisent les mêmes effets. En outre, elle est seule à posséder une activité lytique sur les souches d'entérobactéries. Si la pénicillamine d'origine chimique ralentit temporairement la croissance bactérienne d'*Escherichia coli* K_{12} , son effet est d'une part spécifique sur une souche et d'autre part n'est jamais lytique. Donc la pénicillamine d'origine enzymatique qui paraît chimiquement pure serait plus "nocive" pour le germe que la pénicillamine d'origine chimique.

Une dernière observation nous paraît très importante à rappeler. Des quantités infrabactériostatiques de pénicilline modifient la perméabilité bactérienne. L'addition de pénicillamine à ces quantités a provoqué l'activité antibiotique de la pénicilline. Ceci nous a permis de penser que la pénicillamine d'origine chimique qui n'a aucune activité antibiotique propre, lorsqu'elle a la possibilité de pénétrer dans la bactérie, peut alors participer à l'antibiose.

Tous les résultats obtenus semblent cohérents, pourtant certains faits méritent d'être discutés.

II. DISCUSSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS.

Trois faits doivent retenir plus particulièrement notre attention.

En premier lieu, il semble difficile d'affirmer que la production de pénicillamine résulte d'un processus enzymatique tant que le système enzymatique n'a pas été isolé. Cependant des arguments d'ordre

chimique permettent d'écarter avec plus de vigueur tout autre type d'hydrolyse.

En second lieu, il convient d'expliquer les désordres provoqués par la pénicillamine, molécule non métabolisée.

Et enfin, il convient de tenter d'expliquer comment la pénicillamine peut potentialiser l'activité antibiotique des pénicillines.

A. HYDROLYSE DES PENICILLINES PAR LES BACTERIES ET PAR VOIE CHIMIQUE.

La pénicillamine dosée dans les milieux de culture ne peut pas être le produit de l'hydrolyse spontanée de la pénicilline pour trois raisons.

Chimiquement SCHWARTZ et BUCKWALTER (212) ont montré que, en solution aqueuse, le maximum de stabilité de la benzylpénicilline se situe à pH = 7, la molécule étant assez peu dégradée de pH 4 à 8. Dans les cultures bactériennes, en milieu hypertonique, la pénicillamine apparaît à des pH oscillant entre 4,7 et 5. Les témoins pénicilline ont des pH qui se situent toujours autour de 6,5. Donc les conditions de culture sont dans les limites de la stabilité du substrat.

D'autre part, l'expérimentation a été faite avec des pénicillines stables à pH acide, comme l'ampicilline. Or, les klebsielles, par exemple, dégradent l'ampicilline en pénicillamine avec la même intensité que la benzylpénicilline. Ceci montre donc que la production de pénicillamine n'est pas une conséquence de l'instabilité de la molécule de pénicilline. Enfin, dans les milieux de culture hypertoniques, contenant du 6 APA, les pH sont égaux à 4,5. Pourtant, en présence de colibacilles il n'y a jamais production de pénicillamine. Donc, l'apparition de pénicillamine n'est pas dependante d'une acidification du milieu de culture.

Ces arguments semblent probants et s'ajoutent au fait que dans les tubes témoins sans germes, et dans les cultures traitées préalablement à 100°C, ou maintenues à + 4°C, il n'y a jamais formation de pénicillamine.

Si les mécanismes et les rendements de l'hydrolyse chimique des pénicillines en pénicillamine sont comparés à ceux de l'hydrolyse par les bactéries, d'autres arguments peuvent être apportés.

1°. Mécanisme de l'hydrolyse chimique des pénicillines en pénicillamine.

Pour obtenir chimiquement la pénicillamine, on hydrolyse la fonction β lactame de la molécule de pénicilline à pH = 10. L'acide pénicilloïque formé est alors traité au Cl_2Hg pour être décomposé en pénicillamine (2). Mais la pénicillamine est alors obtenue sous forme d'un dérivé mercurique insoluble, difficile à purifier. Aussi, dans ce travail, l'avons-nous obtenue par hydrolyse chlorhydrique d'une solution aqueuse de pénicilline pendant 1 heure au bain-marie bouillant. A pH = 2, des auteurs comme DENNEN et DAVIS (48) ont montré que la pénicilline est spontanément hydrolysée en acide pénicilloïque et en acide pénillique.

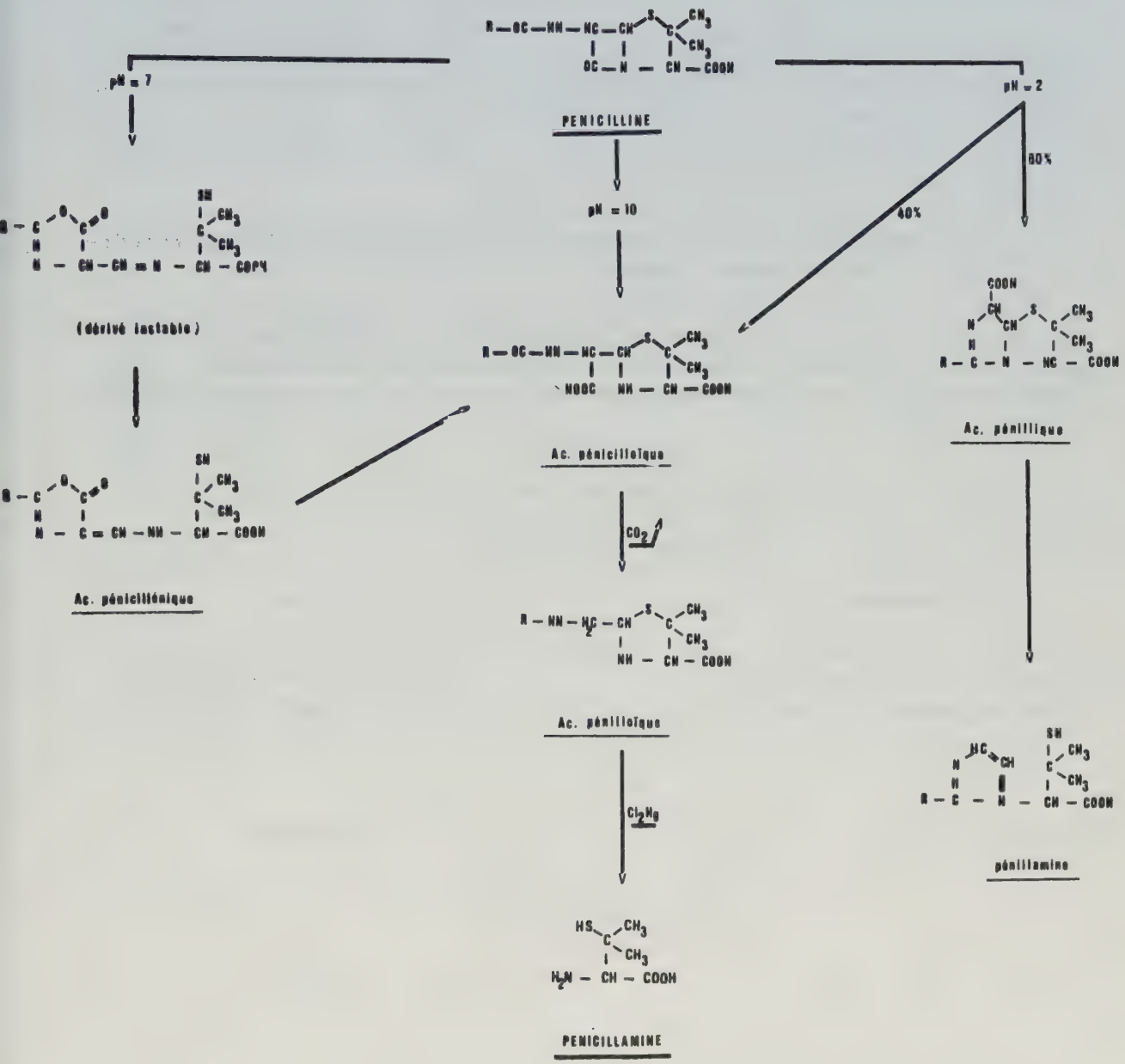


Tableau 46 : DEGRADATION CHIMIQUE DE LA PENICILLINE.

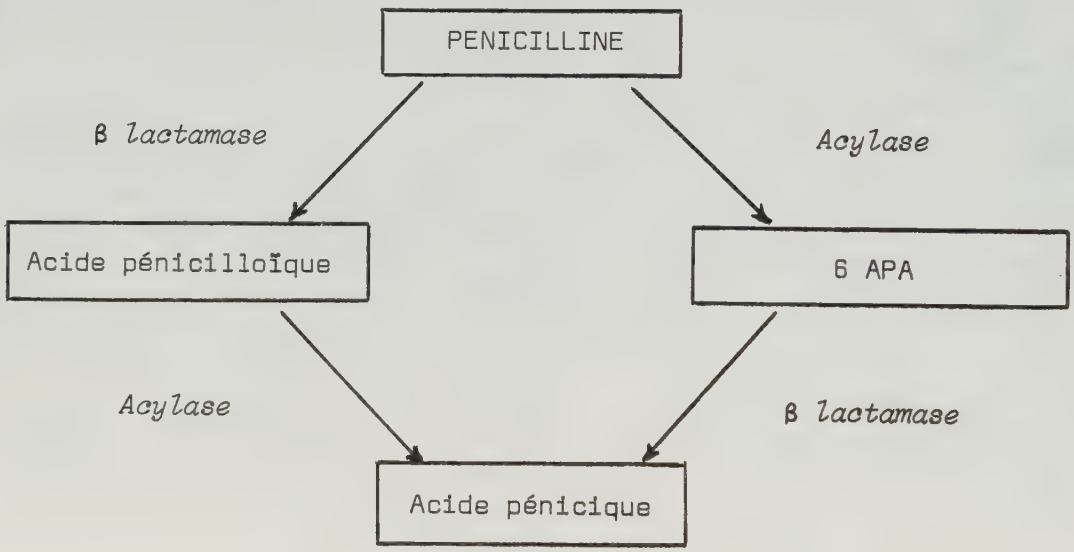
Comme le montre le tableau 46, seul l'acide pénicilloïque peut être dégradé en pénicillamine. Donc le stade acide pénicilloïque est commun aux deux procédés d'hydrolyse.

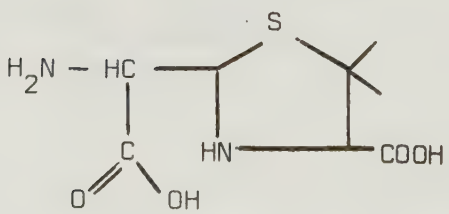
La preuve en est d'ailleurs fournie par la technique de GRAVNETTEROVA (89) qui permet d'obtenir un meilleur rendement en pénicillamine en traitant les solutions de pénicillines 10 minutes à pH = 10 avant de les soumettre à l'hydrolyse chlorhydrique.

Par voie chimique la formation de pénicillamine exige donc obligatoirement le stade acide pénicilloïque.

2°. *Mécanisme de l'hydrolyse par les bactéries des pénicillines en pénicillamine.*

Deux sortes d'enzymes qui sont capables de dégrader la molécule de pénicilline en lui faisant perdre son activité antibiotique sont actuellement connues : ces sont les βlactamases et les acylases. Elles entraînent la formation de trois métabolites selon le schéma de KULMANEK et TADRA (126).





Si le mécanisme enzymatique responsable de la formation de pénicillamine était identique au mécanisme chimique, le stade acide pénicilloïque serait obligatoire. Or, l'acide pénicilloïque est un intermédiaire facultatif puisque deux souches de salmonelles dépourvues de β lactamase sont capables de produire de la pénicillamine. Ces souches sont aussi dépourvues d'acylase, elles dégradent donc en apparence directement la pénicilline en pénicillamine.

Cette différence entre les deux mécanismes d'hydrolyse nous paraît essentielle.

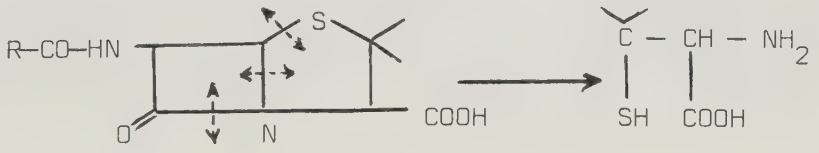
D'autre part, cette différence peut porter non seulement sur les intermédiaires, mais aussi sur le pH, puisque J. MOULENE (155) a montré que dans les poudres acétoniques de Klebsiella n°5, préparées selon la méthode de PRUESS et JOHNSON (183) à pH = 9, la pénicilline était aussi dégradée en pénicillamine.

Enfin, les rendements de production de pénicillamine ne sont pas comparables selon le mode de dégradation du substrat. Donnons deux exemples. Par hydrolyse chimique, le 6 APA est la pénicilline qui est dégradée avec le meilleur rendement ; par hydrolyse enzymatique nous avons noté qu'il ne l'est pas ou très peu. Inversement, la Pénicilline G, l'ampicilline et la diméthoxy pénicilline le sont avec un rendement comparable par hydrolyse enzymatique ; par hydrolyse chimique, l'ampicilline est un bon producteur, les deux autres en sont de très mauvais.

Nous pensons alors pouvoir conclure que les deux mécanismes d'hydrolyse ne sont pas comparables car ils n'admettent pas les mêmes intermédiaires et ils ont des pH et des rendements de production très différents. Donc, l'hydrolyse de la pénicilline en pénicillamine par les bactéries étant en outre augmentée par induction et inhibée par le chloramphénicol doit vraîment être sous dépendance enzymatique.

3°. *Les intermédiaires de la dégradation de la pénicilline en pénicillamine par voie microbienne.*

Pour qu'une molécule de pénicilline soit dégradée en pénicillamine, il faut que trois ruptures s'effectuent.



benzylpénicilline *pénicillamine*

a - Une rupture peut être faite facilement par la β lactamase des bactéries :

il y a formation d'acide pénicilloïque ou d'acide pénilloïque de manière suivante :

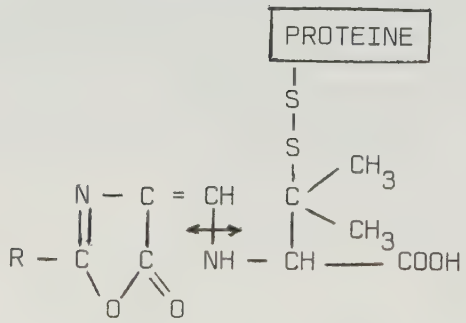
benzylpénicilline → acide pénicilloïque $\xrightarrow{CO_2}$ acide pénilloïque

L'action d'une hydrolyse peut jouer le rôle du Cl_2Hg et couper la molécule de la façon suivante :

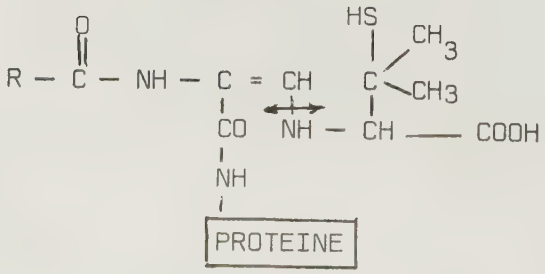
Cette voie métabolique doit exister puisque l'acide pénicilloïque est un substrat susceptible de produire de la pénicillamine comme la pénicilline et que les germes pourvus de β lactamase sont les meilleurs producteurs.

b - Mais le stade acide pénicilloïque n'est pas indispensable à cette production.

Il faut donc envisager une autre voie métabolique. IDSOE et coll. en 1968 ont étudié les déterminants antigéniques responsables de l'allergie à la pénicilline. Ils ont montré (114) que la pénicilline et ses dérivés pouvaient se conjuguer avec des résidus protéiques, en particulier de lysine. Deux dérivés isolés et identifiés nous paraissent particulièrement intéressants car, d'après les auteurs, ils seraient toujours présents dans les préparations de pénicilline, ce sont les "penicillenate antigen" et les "penamaldyl antigen" dont les formules sont les suivantes:



PENICILLENATE ANTIGEN



PENAMALDYL ANTIGEN

Les deux molécules pour être décomposées en pénicillamine ne doivent subir qu'une rupture entre la liaison -C - NH -

Ce mode de dégradation des pénicillines pourrait être compatible avec le métabolisme microbien. La pénicilline, lors de sa fixation sur le germe peut subir une transformation moléculaire en réagissant avec les protéines bactériennes. La pénicillamine, formée d'une manière endogène, peut demeurer liée au germe par un pont disulfure et rester ainsi masquée au dosage jusqu'à la lyse des germes.

D'autre part, un argument chimique peut étayer la théorie. L'acide 6 amino pénicillénique ne peut exister stériquement, or il n'est pas dégradé en pénicillamine.

Ainsi peut-on admettre deux mécanismes qui seraient indépendants, l'un dégraderait la pénicilline en pénicillamine en passant par le stade intermédiaire de l'acide pénicillénique, l'autre dégraderait directement l'acide pénicilloïque en pénicillamine. Deux systèmes enzymatiques différents seraient alors responsables de la formation de pénicillamine. Quelques résultats expérimentaux sont en faveur de cette hypothèse. En particulier l'optimum thermique du système capable de dégrader l'acide pénicilloïque en pénicillamine paraît différent de celui responsable de la dégradation de la Pénicilline G en pénicillamine (p. 98-99).

B. MODE D'ACTION DE LA PENICILLAMINE.

La pénicillamine peut intervenir dans le métabolisme microbien de trois manières différentes .

1 - en tant qu'amino acide analogue de la valine et de la cystéine
2 - en tant qu'agent chélateur,
3 - en tant qu'agent dépolymérisant.

1. La pénicillamine se comporte comme l'analogue d'un amino-acide.

APOSHIAN et BRADHAM (9) ont montré que la L- et la D- pénicillamine, ne sont métabolisées ni par la D amino oxydase, ni par la L cystéine disulfhydrase. Aussi à l'inverse de la cystéine, qui, en excès, est rapidement dégradée dans l'organisme, la pénicillamine apporte une fonction amino acide et une fonction sulfhydryle libres, stables et très actives.

La pénicillamine est essentiellement un amino acide soufré. Elle réagit avec la cystéine en donnant un disulfure mixte de cystéine et de pénicillamine (234). Le disulfure est stable et facile à mettre en évidence dans les urines de cystinuriques traités à la pénicillamine (75) et dans les phénomènes d'allergie cutanée consécutifs au traitement (210).

Or, la cystéine joue un rôle primordial dans le maintien du potentiel d'oxydo réduction de la bactérie. JOCELYN (117) en mesurant les potentiels d'oxydo réduction des différents systèmes, a pu montrer que le glutathion, sous la forme GSH est responsable de la réduction de la cystine en cystéine, comme il l'est de l'acide lipoïque Lip S_2 . Si la cystéine au fur et à mesure de sa formation réagit avec la pénicillamine, ceci créera un déséquilibre constant du potentiel d'oxydo réduction pouvant déborder l'action du glutathion. D'autre part, COHEN et HOCHSTEIN (34) ont étudié l'effet spécifique d'inhibition de la pénicillamine sur la glutathion péroxydase. L'enzyme lorsqu'elle est sous la forme tendue possède les fonctions -SH libres qui doivent être bloquées par la pénicillamine par formation d'un pont disulfure, ce qui entraîne secondairement une diminution du taux de glutathion libre. Tout ceci tend à montrer que la pénicillamine peut jouer un rôle très important dans le système d'oxydo-réduction.

En outre, selon NICKERSON (161) et CAVALLITO (32) les enzymes responsables des bipartitions sont des enzymes ayant des groupements -SH actifs. Aussi la pénicillamine formée dans les bactéries pourraient être directement responsable de l'inhibition des enzymes par simple interférence ou bloquage des fonctions actives.

Enfin, c'est probablement en tant qu'amino-acide soufré qu'elle inhibe les pyocyanines dans les milieux de culture de *Pseudomonas aeruginosa* de façon comparable à la cystéine.

La pénicillamine peut intervenir dans de nombreux métabolismes en se comportant comme l'homologue de la valine. Rappelons que la pénicillamine potentialise l'action antibiotique du 6 APA sur la culture d'*Escherichia coli*. Or, BOMAN et ERICKSON (25) comme HUGO et RUSSEL (109) ont montré que certains amino acides tels que la valine,sans activité antibiotique propre,ont la même action. Les auteurs pensent que la valine se comporterait comme une chaîne latérale et pourrait favoriser la péné - tration du 6 APA dans les bactéries.

Cette hypothèse nous a séduite et nous a inspirée l'expérimentation suivante. Nous avons tenté d'obtenir une nouvelle pénicilline par action d'un excès de chlorure de pénicillamine sur 1.000 µ g par ml de 6 APA, en transposant la technique utilisée par BATCHELOR pour convertir le 6 APA en benzylpénicilline. Alors que le 6 APA doit être à 1000 µg par ml pour donner un halo d'inhibition de 10 mn,que le chlorure de pénicillamine n'inhibe pas la pousse de sarcine, nous constatons que le produit de synthèse possède une activité antibiotique correspondant à environ 200 µg par ml de 6 APA (cliché 27).

Cette expérience, quoique préliminaire, nous paraît revêtir la plus grande importance. En effet, si nous comparons l'action potentialisatrice de la pénicillamine accompagnant le 6 APA ou fixée sur le 6 APA, il apparaît que dans le deuxième cas la potentialisation est beaucoup plus énergique. La pénicillamine liée, au moins partiellement, au 6 APA pourrait intervenir soit en permettant une meilleure fixation de

l'antibiotique sur le germe, soit en favorisant une dégradation du noyau 6 APA en pénicillamine. Nous devons demeurer au stade de l'hypothèse tant que nous n'avons pas purifié cette nouvelle pénicilline.

Enfin, signalons que la pénicillamine interfère spécifiquement avec le phosphate de pyridoxal. APOSHIAN (8) a montré que comme tout amino acide, les pénicillamines D et L réagissent avec les aldimines de la vitamine B 6 ; la liaison est irréversible uniquement avec la L pénicillamine, ce qui peut expliquer l'action léthale et toxique (9) (105) du produit supprimant à la bactérie toute possibilité de décarboxylation.

L'action de la pénicillamine peut donc être variée en intervenant dans des métabolites indispensables à la croissance bactérienne ou en favorisant l'action de substances antibiotiques.

2. *La pénicillamine se comporte comme un chélateur.*

Il est connu que la pénicillamine chélate avec une intensité et une vitesse différentes les cations divalents. Il a été montré dans la deuxième partie de ce travail qui si *in vitro* , elle possède une affinité relativement faible pour les ions Ca^{++} et Mg^{++} , *in vivo*, son action est plus marquée.

Les résultats de nos diverses expériences ont permis de montrer que les germes traités par la pénicillamine subissent une perte globale en cations de l'ordre de 50 pour cent. Ils ont aussi permis de préciser que l'ion Mg^{++} était plus fortement chélaté par le métabolite que l'ion Ca^{++} et ceci aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo*. Or, l'ion Mg^{++} est non seulement indispensable à la stabilité de la paroi bactérienne comme l'ion Ca^{++}, mais il intervient aussi spécifiquement dans l'activité d'un grand nombre d'enzymes et dans la stabilité des ribosomes. Donc, la pénicillamine peut, en tant que chélateur, perturber très fortement le métabolisme microbien.

3. *La pénicillamine se comporte comme un dépolymérisant.*

Comme la cystéine, la pénicillamine possède une forte activité dépolymérisante sur les macroglobulines du sérum (24) (148). Elle peut agir de cette façon soit sur les protéines de la paroi, soit sur les fractions protéiques ribosomales, soit sur les enzymes elles-mêmes.

Ainsi peuvent s'expliquer quelques désordres morphologiques et physiologiques provoqués tant par la pénicillamine d'origine chimique que par celle d'origine microbienne. Nous voudrions montrer maintenant comment la pénicillamine peut participer à l'antibiose et expliquer les effets secondaires provoqués par la pénicilline. Ces effets ont été observés dans le temps par de très nombreux auteurs comme nous l'avons vu dans l'historique et demeurent souvent inexpliqués.

C. COMMENT LA PENICILLAMINE PEUT-ELLE POTENTIALISER L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DES PENICILLINES ?

Nous venons de voir que la pénicillamine,en bloquant les groupements actifs -SH,peut bloquer les bipartitions et perturber les systèmes d'oxydo réduction. Or, il a été observé que la pénicilline inhibe l'activité des enzymes respsonsables des bipartitions et qu'elle modifie très fortement le système d'oxydo réduction. Elle aurait même une action antimétabolique spécifique vis-à-vis du glutathion. Jusqu'à présent, aucune théorie n'est capable d'expliquer comment de tels effets peuvent être produits par la pénicilline elle-même car la molécule ne possède aucune fonction -SH libre. Faut-il préciser que la pénicillamine est le seul intermédiaire de dégradation, qui ayant la fonction -SH libre, soit stable?

L'action de la pénicillamine permet d'expliquer d'autres désordres métaboliques observés chez les germes traités par la pénicilline.

La pénicillamine peut agir comme l'EDTA sur les activités de la membrane cytoplasmique. SKOU (217) en 1965 a pensé que les membranes bactériennes se comportaient comme toutes les membranes et qu'en particulier l'incorporation de substrat exigeait une accumulation de K^+ et une sortie de Na^+, une source d'énergie qui est l'ATP, la présente d'ions Mg^{++} et un certain nombre de fonctions -SH libres. L' EDTA agit sur le système exclusivement en bloquant les ions. GRENSON (91) avait attribué un rôle important aux cations dans le transport des métabolites à travers les membranes cellulaires avant qu'ASBELL et EAGON (10) ne les découvrent. En effet les systèmes responsables des transports de substrat dans les bactéries sont inhibés d'une manière irréversible par l'unique action de l'EDTA-TRIS, les systèmes inductibles étant encore plus sensibles. Or, selon MONTGOMERIE et coll. (154) la pénicilline perturbe les échanges du Na^{++} et du K^+ en provoquant une importante accumulation du Na^{++} à l'intérieur des bactéries. La pénicillamine peut très bien être responsable de cet effet car par l'intermédiaire de sa fonction sulfhydrile libre, elle peut bloquer l'enzyme elle-même par établissement d'un pont disulfure. Elle peut intervenir aussi comme l'EDTA.

Cette hypothèse nous paraît satisfaisante à l'esprit et peut même être poussée plus loin. Tout dernièrement, SILVER et DAN CLARK (215) ont décrit un système spécifique responsable du transport du Mg^{++} à travers la membrane d'*Escherichia coli*. Or, si nous avons montré que la pénicillamine diminue fortement les quantités de Mg^{++} dans le germe, il est connu, que la pénicilline provoque le même effet. la pénicillamine formée dans le germe au cours de la dégradation de la benzylpénicilline,en modifiant la structure de la paroi et en agissant plus directement sur les enzymes responsables des transports des métabolites peut très bien être la seule responsable de la carence du germe en Mg^{++}. Le Ca^{++} qui lui n'est soumis à aucun système spécifique, peut

remplacer partiellement le Mg^{++} . Rappelons qu'il a été prouvé dans ce travail que la pénicillamine carençait davantage le germe en Mg^{++} qu'en Ca^{++}.

Ainsi l'action de la pénicilline sur les ions Na^{+} , K^{+} et Mg^{++} qu'aucune théorie actuelle n'explique, pourrait être due à la seule activité de la molécule de pénicillamine présente dans la bactérie.

En outre, ABRAMS et BARON (3) ont montré que la fixation de l'ATPase sur la membrane bactérienne était dépendante de la quantité de Mg^{++} présente (50). En l'absence du cation l'enzyme serait non seulement liée très lâchement aux sites récepteurs, mais encore le nombre de ces derniers serait fortement diminué. L'ATP, source énergétique essentielle, serait alors très peu dégradé. Si on admet que la pénicillamine prive la membrane de Mg, on peut expliquer la demande excessive d'ions phosphates par les germes traités par la pénicilline. La pénicillamine serait responsable de la perturbation du transfert de nombreuses liaisons phosphates.

ASBELL et EAGON (10), étudiant l'action de l'EDTA-TRIS, ont pu montrer que le Mg^{++} est indispensable à l'intégration de certains composés comme la L-alanine ou le D glucose. La pénicillamine peut avoir la même influence, ce qui pourrait expliquer que 70 pour cent de glucose seulement puisse s'intégrer au cell-wall en présence de pénicilline.

Enfin, ASBELL et EAGON (63) ont montré que l'EDTA-TRIS était capable d'inhiber la multiplication bactérienne puisque seuls les "osmoplates" qui réversent en présence de cations divalents, récupèrent leur capacité de se multiplier . La pénicillamine pourrait bloquer la multiplication des sphéroplastes pénicilline non seulement par sa fonction sulfhydryle mais encore par sa fonction chélatrice.

La pénicillamine peut en outre, provoquer des désordres métaboliques comme l'EDTA. LEIVE a montré qu'un traitement de 2 mn par l'EDTA-TRIS n'affecte pas la vitalité de la souche, mais cause la libération d'un grand nombre de nucléotides définis par l'auteur comme étant des "acid soluble UV absorbing pool". En 1966, NEU, ASHMAN et PRICE (159), puis d'autres auteurs (158) (160) ont observé que ce traitement augmentait en particulier les quantités d'enzymes libérés normalement par choc osmotique. Les enzymes touchées sont, d'après DVORAK (57), la phosphodiestérase, la 5' nucléotidase (235) (58), la phosphatase alcaline (127) (263) (214), la RNase I, la DNase II. La pénicilline inhibe très fortement l'activité des phosphatases alcalines. Pourquoi la pénicillamine ne serait-elle pas responsable de cet effet en agissant comme l'EDTA ? Cette étude n'a pas encore été entreprise, mais semble particulièrement intéressante. D'autant plus que ROGERS en 1968 (191) a montré que l'enzyme est localisée non seulement dans le périplasme comme les autres enzymes précitées, mais est aussi liée au cell wall et à la membrane cytoplasmique. Or, l'étude morphologique des germes traités par la pénicillamine indique une forte perturbation de l'espace périplasmique, qui semble contenir du matériel cellulaire.

Ainsi au niveau des enveloppes bactériennes, l'action propre de la pénicillamine peut renforcer l'action spécifique de la pénicilline en provoquant une augmentation de la perméabilité cellulaire. Ceci se traduit par une diminution des cations et des activités enzymatiques due probablement à la libération des enzymes dans le milieu extérieur. D'autres activités sont au contraire augmentées, ce qui doit dépendre d'une meilleure pénétration du substrat à travers la paroi et la membrane cytoplasmique.

Enfin, tout dernièrement, TUCKER et WHITE (245) ont montré que l'EDTA faisait perdre à *Haemophilus parainfluenzae* 15 à 20 pour cent de ses cytochromes c et b. Or, la pénicilline inhibe le système des cytochromes.

Etudiant la structure des ribosomes des sphéroplastes pénicilline, EHRENFELD et KOCH (66) ont montré que la synthèse d'ARN n'est pas interrompue, mais que les fractions ribosomales formées sont instables et sont dégradées secondairement. L'effet de la pénicilline paraît comparable à une privation du germe en Mg^{++}. La pénicillamine endogène pourrait, en chélatant le Mg^{++}, provoquer la solubilisation des ARN.

Rappelons que PRESTIDGE et PARDEE (182) avaient été particulièrement intrigués par cette action de la pénicilline et qu'ils avaient établi un rapport étroit entre la solubilisation du RNA et l'action léthale de la pénicilline. La pénicillamine, produit de la dégradation enzymatique de la pénicilline, pourrait être l'agent provoquant secondairement la mort et la lyse des germes. La mort serait due à un arrêt de la synthèse protéique soit par solubilisation du RNA, soit par bloquage des fonctions sulfhydryles libres du RNA soluble (243) (232) (200). HELE (106) a montré en effet que la synthèse protéique était dépendante non seulement de la présence de Mg^{++} mais aussi de ces fonctions -SH. La lyse serait due ensuite à une désagrégation du système membranaire des bactéries.

Avant de clore ce chapitre, nous croyons qu'il est important d'insister sur le fait qu'aucun auteur, à notre connaissance, n'a décrit la présence de pénicillamine dans les hydrolysats bactériens. KULMANEK et TADRA, se sont pourtant attachés à l'étude des produits d'hydrolyse bactérienne de la pénicilline. S'ils n'ont pas identifié de pénicillamine,bien que leurs conditions opératoires soient comparables aux nôtres, trois raisons en sont la cause :

1°. Ils ont travaillé avec des suspensions d'entérobactéries et de staphylocoques en eau distillée stérile, contenant 2.000 µ g par ml de pénicilline. Il a été noté que la production de pénicillamine est très mauvaise lorsque les germes sont au repos.

2°. Ils ont effectué leur dernier dosage à la 24ème heure de contact, or c'est le temps minimum pour l'apparition du métabolite dans les solutions.

3°. Les métabolites ont été identifiés par chromatographie sur papier en utilisant comme révélateur, soit la ninhydrine, soit l'iode.

Or, par ces méthodes, des quantités de pénicillamine inférieures à 20 µg par ml ne sont pas décelées.

J. LATRILLE en détectant la pénicillamine dans les hydrolysats bactériens d'*Escherichia coli*, semble avoir fait preuve d'une grande originalité et a ainsi permis une étude qui s'est révélée passionnante.

CONCLUSION.

Nous venons de mettre en évidence l'importance biologique que possède une molécule comme celle de pénicillamine. Elle est capable de perturber un très grand nombre de système enzymatiques, soit comme un petit amino acide analogue à la valine, soit comme un dérivé soufré, soit comme un agent chélateur.

Il semble que de très nombreux effets secondaires observés chez des germes traités par la pénicilline, inexpliqués par la théorie de TIPPER et STROMINGER puissent l'être par notre théorie. Lors de l'hydrolyse des pénicillines par les entérobactéries, il y a formation endogène de pénicillamine qui, étant particulièrement réactive, peut agir sur de nombreux métabolismes. Elle n'est révélable dans le milieu de culture que tardivement, probablement après la lyse bactérienne. Elle peut agir soit sur les dérivés soufrés, soit sur les cations divalents et,en particulier,carencer le germe en Mg^{++}.

Des travaux nous paraissent particulièrement intéressant à présenter. En premier lieu celui de KENNEL et KOTOULOS (121) qui ont cultivé *Aerobacter aerogenes* dans un milieu synthétique carencé en Mg^{++}. Les modifications morphologiques des germes décrites par les auteurs sont comparables à celles provoquées par la pénicilline elle-même. GARRETT (80) (81) (82) a observé en 1968 qu'en carençant *Bacillus subtilis* en Mg^{++}, il obtenait l'accumulation intra-cellulaire des mêmes nucléotides, à base d'acide N acétyl muramique, que ceux décrits par PARK et STROMINGER en 1957.

L'observation de GARRET est très importante puisqu'elle résumerait l'action de la pénicilline à une simple privation du germe en Mg^{++}. Cela pourrait sous-entendre que l'action serait d'une part,aspécifique et d'autre part, provoquée par une molécule possédant une forte activité chélatrice vis-à-vis de ce cation. Or, la pénicilline ne possède aucune activité de cet ordre.

Pour notre part, nous pensons que le mode d'action de la pénicilline ne peut guère se résumer en une activité unique. La pénicillamine n'apparaît que trop tardivement pour être responsable des premiers effets de la pénicilline, elle peut seulement jouer un rôle prépondérant sur le métabolisme des cations divalents. Or, il est connu que tous les antibiotiques dont le mécanisme d'action se situe au niveau de la biosynthèse de la paroi bactérienne, comme la novobiocine (27) (219), la bacitracine (18) (256), la vancomycine (216) (199), la rystocétine ont leur

action antibiotique accrue en présence d'EDTA. L'intégrité de la paroi bactérienne est très dépendante de la présence de cations bivalents (100).

Nous pensons surtout que la molécule de pénicillamine est très probablement la "substance lytique" étudiée par PRESTIDGE et PARDEE. En effet, il faut qu'il y ait métabolisme microbien pour qu'il y ait formation de pénicillamine, cette dernière étant un métabolite de l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline. De plus, à elle seule, la molécule de pénicillamine peut entraîner la mort du germe par innibition des enzymes respiratoires et arrêt de la synthèse protéique. Elle peut ensuite provoquer la lyse du germe par désorganisation intime de la paroi et de la membrane cytoplasmique des bactéries.

---°---

CONCLUSION GENERALE

Le mécanisme d'action de la pénicilline, malgré le grand nombre de travaux consacrés à son étude, est encore mal connu. La théorie admise de nos jours est que la pénicilline bloque la synthèse de la paroi bactérienne en se combinant à la transpeptidase, enzyme indispensable à la constitution du mucocomplexe de PARK. Elle explique de nombreux troubles métaboliques provoqués par la pénicilline, telle l'importante accumulation dans le cytoplasme des nucléotides qui ne sont plus incorporées dans la paroi et des précurseurs de l'acide téchoïque qui ne peuvent plus se lier covalentiellement au mucocomplexe. Elle explique aussi la diminution de la synthèse de l'ARN due au blocage des molécules d'uridine. Enfin, si la pénicilline n'agit qu'au niveau du mucocomplexe de PARK, la théorie explique parfaitement pourquoi l'antibiotique est plus actif sur les germes à Gram + que sur les germes à Gram -. LEDERBERG admettait d'ailleurs que l'action de la pénicilline sur la paroi bactérienne, induisait l'apparition de sphéroplastes, stade initial et transitoire de l'antibiose.

Cependant bien des effets demeurent inexpliqués et nombreux sont les auteurs qui comme ROGERS (190) pensent que l'inhibition de la synthèse de la paroi ne doit pas être le seul moyen d'action de la pénicilline. Des auteurs tels que HUGO et RUSSEL affirment d'ailleurs que l'effet léthal de l'antibiotique n'est pas une conséquence de la fragilité des formes sphéroplastiques.

D'autre part, les travaux de LATRILLE ont montré que deux pénicillines, la benzylpénicilline et le 6 APA, possédant la même fonction β lactame, n'induisaient pas les mêmes désordres de structure au niveau de la paroi d'*Escherichia coli*. Donc, LATRILLE comme BOMAN et ERIKSSON pensent que la chaîne latérale des pénicillines joue un rôle capital dans l'antibiose.

Enfin PRESTIDGE et PARDEE ont montré que le mécanisme d'action de la pénicilline devait se dérouler en deux temps. Le premier temps correspondrait à la liaison de la pénicilline avec la transpeptidase, ce qui entraîne l'arrêt de la synthèse de la paroi. Le deuxième temps exigerait "la synthèse d'une substance lytique". Ce ne sont pas les seuls auteurs qui ont avancé cette hypothèse, la lyse bactérienne étant toujours

tardive, postérieure à la dégradation de la pénicilline, et pouvant être, pendant un court laps de temps, évitable.

L'agent lytique n'a été ni isolé, ni identifié. Or, LATRILLE, induisant des sphéroplastes d'*Escherichia coli* par la benzylpénicilline, a été amené à détecter de la pénicillamine dans les milieux de culture. Cette molécule possède un petit poids moléculaire, une analogie structurale avec la cystéine et la valine, et trois fonctions chimiques particulièrement réactives. Nous nous sommes demandé si, vu son apparition tardive dans les milieux de culture, elle ne pouvait pas être l'agent lytique soupçonné par de nombreux auteurs. En effet, par sa fonction -SH libre, elle peut intervenir dans les phénomènes d'oxydo réduction et par sa fonction chélatrice, elle peut carencer le germe en cations indispensables. Ceci nous a conduit dans un premier temps à étudier la dégradation par les entérobactéries de deux pénicillines naturelles, de quatre pénicillines semi-synthétiques et du 6 APA, et à noter les conditions d'apparition de la pénicillamine et les quantités produites.

Il est apparu que la pénicillamine est formée dans tous les milieux de culture hypertoniques, plus irrégulièrement dans les milieux isotoniques, par dégradation de toutes les pénicillines sauf le 6 APA. Cette exception nous a paru particulièrement intéressante, soulignant l'importance de la chaîne latérale. Sa production est certainement sous dépendance enzymatique mais en aucune façon dépendante de la β lactamase et de l'acylase. Et fait plus marquant, nous avons montré que la molécule est de formation endogène et libérée dans le milieu extérieur uniquement après lyse bactérienne. La pénicillamine ne serait-elle par l'agent lytique de PRESTIDGE et PARDEE ?

Pour argumenter cette hypothèse, nous avons recherché les modifications, tant morphologiques que physiologiques, provoquées par la molécule de pénicillamine d'origine chimique. Il a été constaté, qu'en milieu hypertonique, elle est capable d'induire des sphéroplastes chez toutes les entérobactéries étudiées ; toute la population n'est pas affectée, mais la plupart des germes sont boursouflés et vacuolisés. En microscopie électronique, il a été observé que le sphéroplaste pénicillamine n'est plus limité que par la membrane cytoplasmique ; ces formes ont donc été fragiles comme en témoigne les nombreux "ghosts" présents dans les préparations et ne peuvent persister qu'en milieu hypertonique.

Au point de vue physiologique, les germes traités par la pénicillamine accusent une nette modification de leur perméabilité. Ce qui est intéressant à noter c'est que la pénicillamine agit comme l'EDTA sur le métabolisme des cations divalents. C'est donc essentiellement l'action chélatrice de la pénicillamine qui intervient. Celle-ci, étudiée sur les ions Ca^{++} et Mg^{++}, s'est montrée particulièrement accusée avec l'ion Mg^{++}. Pourtant, dans tous les cas, l'action de la pénicillamine n'a pu être inhibée par un excès de calcium et de magnésium, elle peut donc être différente .

Enfin, nous avons observé que la pénicillamine potentialise l'activité antibiotique des pénicillines et même du 6 APA sur le colibacille, la sarcine et le 209 P. Depuis les travaux de WARREN et HORWITZ

(251) il est connu que des quantités subinhibitrices de pénicilline modifient la perméabilité bactérienne en provoquant l'accumulation de polysaccharides ; ceci favorise très probablement la pénétration de la pénicillamine exogène à l'intérieur du germe. La pénicillamine doit alors participer avec les pénicillines à l'antibiose, son action se faisant sentir dès les premières heures de culture.

Ces observations, nous ont amenée à conclure que la pénicillamine d'origine chimique était loin de se comporter comme une molécule inerte. Or, la pénicillamine d'origine enzymatique, provenant de l'hydrolyse de l'acide benzylpénicilloïque par la souche de Klebsiella 418 s'est révélée 4 à 5 fois plus active que la pénicillamine d'origine chimique. Elle est même la seule à posséder une activité lytique se manifestant sur le colibacille et le staphylocoque 209 P. Ceci permet de supposer qu'*in vivo* cette pénicillamine doit entraîner des désordres métaboliques beaucoup plus accentués que ceux provoqués par la pénicillamine chimique telle qu'elle a été étudiée dans la deuxième partie de ce travail. D'autre part, étant de formation endogène, elle n'a pas besoin de traverser les membranes bactériennes pour exercer ses diverses activités.

La différence d'activité de la pénicillamine d'origine enzymatique par rapport aux autres, nous a toujours paru surprenante. Pourtant à la chromatographie sur papier, la fraction isolée de cette pénicillamine paraît pure. Depuis les travaux d'IDSOE (114) et plus récemment de STEWART et autres (224) (225) (4) (167) (258), il a été observé qu'une partie des produits de dégradation des pénicillines peut se polymériser ou se combiner à des dérivés protéiques. C'est ainsi qu'il y aurait formation du "penamaldyl antigen" et du "penicillenate antigen", par exemple, qui auraient des propriétés allergisantes. Le "penicillamin antigen" a été isolé et identifié. La pénicillamine est liée à la protéine par un pont disulfure. Aussi nous pensons que la fraction de pénicillamine que nous avons isolée par chromatographie sur résines échangeuses d'anions contient peut-être des traces de ce dérivé indécelables aux U.V. D'après les auteurs, ces dérivés complexes de dégradation conservent souvent une activité antibiotique. Ainsi la pénicillamine endogène , liée probablement aux protéines peut avoir une activité lytique propre.

De toute cette étude, il ressort que la pénicillamine est une molécule fréquemment détectée dans les milieux de culture au cours de l'induction sphéroplastique par la pénicilline. Elle peut participer à l'antibiose en entraînant la mort du germe par blocage d'activités enzymatiques essentielles à la respiration et à la bipartition. Elle peut même, en carençant le germe en Mg^{++}, bloquer la synthèse protéique par désorganisation des ribosomes. Enfin, elle peut participer à la lyse des germes en désorganisant les structures membranaires. Synthétiser une pénicilline dont la chaîne latérale serait la pénicillamine et montrer qu'elle est plus active sur les germes que celles connues, serait démontrer la puissance d'action de la pénicillamine. Aussi est-ce un projet d'avenir.

---°---

B I B L I O G R A P H I E

---

1. ABRAHAM (E.P.). - The chemistry of new antibiotics. Amer. Journ. of Med., 1965, 39, p. 692.

2. ABRAHAM (E.P.), CHAIN (E.), BAKER (W.) & ROBINSON (R.) - Penicillamin, a characteristic degradation product of penicillin. Nature, 1943, 151, p. 107.

3. ABRAMS (A.) & BARON (C.) - Reversible attachment of adenosine triphosphatase to streptococcal membranes and the effect of magnesium ions. Biochemistry, 1968, 7, n° 2, p. 501.

4. ACRED (P.), BROWN (D.M.), HARDY (T.L.) & MANSFORD (K.) - A new approach to studying the protein-binding properties of penicillins. Nature 1963, 199, p. 758.

5. ACRED (P.), BROWN (D.M.), TURNER (D.H.) & WRIGHT (D.). Pharmacology of methicillin. Pharm. Chemotherapy, 1961, 17, n° 1, p. 70.

6. ALBAHARY (C.) - Chélateurs et intoxications par les métaux lourds. La Revue du Prat. 21.12.1967, XVII, n° 33.

7. ALBERT (A.) - Quantitative studies of the avidity of natural occuring substances for trace metals. I. Amino acids having only two ionizing groups. 1950, 47, p. 531.
II. Amino acids having three ionising groups. Biochem. J. 1951, 50, p. 690.

8. APOSHIAN (H.V.) - Biochemical and pharmacological properties of the metal binding agent penicillamin. Fed. Pro. 1961, 20, n° 3, p. 185.

9. APOSHIAN (H.V.) & BRADHAM (L.S.) - Metabolism in vitro of the sulfhydryl amino acids, L- and D-penicillamin. Biochem. Pharm. 1959, 3, p. 38.

10. ASBELL (M.A.). - Role of divalent cations in the structure of the cell wall of Pseudomonas aeruginosa, and in active transport. Dissert. Abstr. 1968, 28, n° 10, p. 3985.

11. ASBELL (M.A.) & EAGON (R.G.). - Role of multivalent cations in the organization structure, and assembly of the cell wall of Pseudomonas aeruginosa.
J. of Bact. 1966, 92, p. 380.

12. BAILENGER (J.), NEUZIL (E.) & LE HIR (A.). - Utilisation de l'alginate de sodium dans les techniques de montage biologique.
Compt. Rend. Séances de la Soc. de Biol. 1951, 145, p. 574.

13. BAKALOV (D.) & LILOV (L.). - Spectrophotometric study of penicillin-cystein interaction.
Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences. 1964, 17, n° 8, p. 761.

14. BATCHELOR (F.R.), CHAIN (E.B.), RICHARDS (M.) & ROLINSON (G.N.). - 6-amino penicillanic acid. VI - Formation of 6 amino penicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis.
Proc. Roy. Soc. S.B., 1961, 154, p. 522.

15. BATCHELOR (F.R.), DOYLE (F.P.), NAYLER (J.H.C.) & ROLINSON (G.N.). - Synthesis of penicillin : 6 amino penicillanic acid in penicillin fermentation.
Nature 1959, 183, p. 257.

16. BAYER (M.E.). - The cell wall of Escherichia coli : early effects of penicillin treatment and deprivation of diaminopimelic acid.
J. Gen. Microb. 1967, 46, p. 237.

17. BEGGS (W.) & ROGERS (P.). - Galactose repression of β galactosidase induction in Escherichia coli.
J. of Bact. 1966, 91, p. 1869.

18. BEINING (P.R.), PINSLEY (C.L.) & WEINBERG (E.D.). - Alteration of permeability of protoplasts of Bacillus megaterium by bacitracin and selected metallic ions. Antimicrobial agents and chimotherapy. 1966, p. 308.

19. BENAZET (F.), DUBOST (M.), JOLLES (G.), LEAU (O.), PASCAL (C.), PREUD'HOMME (J.), TERLAIN (B.). - Liaisons et modifications des antibiotiques in vivo (sang et foyer infectieux).
Rev. Biol. Med., 1968, 57, n° 5, p. 376.

20. BENIGNI (F.), CIERI (L.) & ORLANDINI (J.). - Chromatografia su carta della penicilline ed identificatione mediante il reattivo di Schiff.
Ann. Chim. Ital. 1961, 51, n° 5, p. 441.

21. BENTO (J.), FALINI (R.), LUBINSKI (O.) & MAURI (M.). - Determination of the partition coefficient of benzyl penicillin free acid between water and butyl acetate at various concentrations.
Inst. Sup. Sanita. Roma Italy. Chem. and Industry G.B., 1962, n° 14, p. 652.

22. BIRDSELL (D.C.) & COTA ROBLES (E.H.). - Production and ultrastructure of lysozyme and EDTA lysozyme spheroplasts of Escherichia coli.
J. of Bact. 1967, 93, p. 427.

23. BLAIR (R.M.) & APOSHIAN (H.V.). - The inhibition of Escherichia coli by L-penicillamin and its reversal by isoleucine, valine or leucine.
Biochem. Biophys. acta Scand. 1958, 30, p. 214.

24. BLOCK (H.S.), PRASAD (A.) & ANASTASI (A.). - Serum protein changes in Waldenstrom's macrobulinemia during penicillamin administration.
Proc. Cent. Soc. Clin. Res. 1958, 31, p. 12.

25. BOMAN (H.G.) & ERIKSSON (K.G.). - Penicillin induced lysis in Escherichia coli.
J. Gen. Microb. 1963, 31, p. 339.

26. BOXER (G.E.) & EVERETT (P.M.). - Colorimetric determination of benzyl penicillin. Colorimetric determination of total penicillins.
Analytical Chem. 1949, 21, n° 6, p. 670.

27. BROCK (T.D.). - Effect of Mg ion deficiency on Escherichia coli and possible relation to the mode of action of novobiocin.
J. of Bact. 1962, 84, p. 679.

28. BRUNS (B.P.), SOVCKAJO (E.M.), SHELLENBERG (N.N.), LIBINSON (G.S.), KOLYGINO (T.S.) & DRUZHININA (E.N.). - Propriétés physiques et chimiques de l'acide 6-amino pénicillanique : courbes de titrage et solubilité (en Russe).
Antibiotiki S.S.S.R., 1962, 7, n° 5, p. 440.

29. BURTON (J.) & CARTER (W.). - Purification and characterisation of the lipid A component of the lipopolysaccharides from Escherichia coli.
Biochemistry, 1964, 3, p. 411.

30. CARSON (K.J.) & EAGON (R.G.). - Observations of the structural role of the mucopeptide component and of divalent metals in cell walls of Pseudomonas aeruginosa.
Dissert Abstr. B., 1967, 27, n° 10, p. 3384.

31. CARTER (W.) & Mac CARTY (K.S.). - Molecular mechanisms of antibiotic action.
Annals of intern medecin 1966, 64, n° 5, p. 1087.

32. CAVALLITO (C.J.). - Penicillin site of action.
Science, 1947, 105, p. 235.

33. CHAIN (E.) & DUTHIE (E.S.). - Bactericidal and Bacteriolytic action of penicillin on the Staphylococcus.
Lancet, 1945, 248, p. 652.

34. COHEN (G.) & HOCHSTEIN (P.). - Glutathione peroxydase : inverse temperature dependance and inhibition by sulfide and penicillamin.
Feder. Proc. U.S.A., 1965, 24, n° 2, part. I, p. 605.

35. COLLINS (J.F.) & RICHMOND (M.H.). - A structural similarity between N acetyl muramic acid and penicillin as a basis for antibiotic action.
Nature, 1962, 195, p. 142.

36. COOPER (P.D.). - The site of action of penicillin. Some properties of the penicillin binding component of Staphylococcus aureus.
J. Gen. Microbiol. 1955, 12, p. 100.

37. COOPER (P.D.). - Site of action of radiopenicillin.
Bacteriol. Rev. 1956, 20, p. 28.

38. COOPER (P.D.) & ROWLEY (D.). - Investigations with radioactive Penicillin.
Nature 1949, 163, p. 480.

39. COOPER (P.D.) & ROWLEY (D.). - Investigations with radioactive penicillin. Congrès International de Biochimie.
Cambridge, août 1949, p. 442.

40. COOPER (P.D.), ROWLEY (D.) & DAWSON (I.M.). - Location of radioactive Penicillin in Staphylococcus aureus after contact with drug.
Nature 1949, 164, p. 842.

41. COSTER (H.G.L.), GEORGE (E.P.) & ROGERS (P.L.). - Ionic relations as a function of metabolism in Aerobacter aerogenes.
Austral. J. Biol. Sci. 1968, 21, n° 4, p. 691.

42. COTA-ROBLES (E.H.). - Internal membranes in cells of Escherichia coli.
J. Ultrastruc. Research, 1966, 16, p. 626.

43. CRAWHALL (J.C.), SCOWEN (E.F.) & WATTS (R.W.E.). - Effect of penicillamin on cystinuria.
British medic. J. 1963, 2, p. 588.

44. CRAWHALL (J.C.), SCOWEN (E.F.) & WATTS (R.W.E.). - Further observations on use of D-penicillamin in cystinuria.
British medical J. 1964, 1, p. 1411.

45. CROOKS (H.M.). - The Chemistry of penicillin. Princeton University Press. p. 469.

46. CSANYI (V.). - A modified iodometric method of penicillinase assay.
Acta Physiol. Hung, 1961, 18, p. 261.

47. DAVIES (R.) . - Mercapto ethanol and protoplast formation and invertase release from Saccharomyces fragilis and other yeasts.
Abb. Dtsch. akab. Wissensch. Berlin, Kl. Med. 1966, paru 1967, n° 6, p. 195.

48. DENNEN (D.W.) & DAVIS (W.W.). - Degradation reactions of penicillins. I - Formation kenetics of penillic acid penicilloïc acid in acidic solutions. Antimicrob. agents and Chemotherapy. 1961-1962, p. 531.

49. DOORNBOS (D.A.) & coll. - Metallic complexes : cystéine, D penicillamine, D penicillamine, N acetyl. Metal complexes of drugs. Pharm. Weckllod. 1964, 99, p. 3 et 289.

50. DOYLE (J.) & EVANS (J.). - Membrane Mg^{++} (Ca^{++}) activated adenosine triphosphatase of Escherichia coli : characterisation in the membrane-bound and solubilized states. J. of Bact. 1970, 104, p. 1203.

51. DOYLE (F.P.), LONG (A.A.W.), NAYLER (J.H.C.) & STOVE (E.R.). - New penicillins stable toward both acid and penicillinases. Nature 1961, 192, p. 1183.

52. DUBOS (R.J.). - Antimicrobial agents of biologic origin. J. Amer. Med. Ass. 1944, 124, p. 633.

53. DUFRENOY (J.) & PRATT (R.). - Cytochemical mechanisms of penicillin action. I - Oxidation reduction levels. J. of Bact. 1947, 53, p. 657.

54. DUGUID (J.P.). - The sensitivity of bacteria to the action of penicillin. Edinburg med. J. 1946, 53, p. 401.

55. DULONG de ROSNAY (Ch.), LATRILLE (J.) & CASTAGNOU (F.). - Induction par la pénicillamine de formes bacteriennes anormales. Annales Institut Pasteur 1969, 117, p. 339.

56. DULONG de ROSNAY (Ch.), CASTAGNOU (F.) & LATRILLE (J.). - Production de pénicillamine au cours de l'induction de sphéroplastes pénicilline. Annales de l'Institut Pasteur, 1970, 118, p. 278.

57. DVORAK (H.). - Metallo-enzymes released from Escherichia coli by osmotic shock I - Selective depression of enzymes in cells grown in the presence of EDTA. J. of Biol. Chem. 1968, 243, p. 2640.

58. DVORAK (H.) & HEPPEL (L.). - Metallo enzymes released from Escherichia coli by osmotic shock. II - Evidence that 5' nucleotidase and cyclic phosphodiesterase are Zn metallo-enzymes. J. of Biol. Chem. 1968, 243, p. 2647.

59. EAGLE (H.). - A paradoxal zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin. Science 1948, 107, p. 44.

60. EAGLE (H.). - The binding of penicillin in relation to its cytotoxic action. I - Correlation between the penicillin sensitivity and combining activity of intact bacteria and cell free extracts. J. Exp. Med. 1954, 99, p. 207.

61. EAGON (R.G.). - Observations of the structural role of the mucopeptide component and of divalent metals in cell walls of Pseudomonas aeruginosa.
Dissert. Abstract. B. 1967, 27, n° 10, p. 3384.

62. EAGON (R.G.) & ASBELL (M.A.). - Effect of divalent cations on trans membrane transport of substrates by Pseudomonas aeruginosa.
Bacteriological reviews 1968, p. 111, P. 4.

63. EAGON (R.G.) & ASBELL (M.A.). - Effect of divalent cations on the uptake and oxidation of substrates by Pseudomonas aeruginosa.
J. of Bact. 1969, 97, p. 812.

64. EBEL (J.P.), VENDRELY (R.) & TULASNE (R.). - Action de la pénicilline sur le métabolisme phosphoré et azoté de quelques bactéries.
C. Rend. Acad. Sci. 1950, 231, p. 458.

65. EDWARDS (J.R.) & PARK (J.T.). - Correlation between growth inhibition and the binding of various penicillins and caphalosporins to Staphylococcus aureus.
J. of Bact. 1969, 99, p. 459.

66. EHRENFELD (E.R.) & KOCH (A.L.). - R.N.A. synthesis in penicillin spheroplasts of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta. 1968, 169, p. 44.

67. ENSIGN (J.C.) & WOLFE (R.S.). - Characterisation of a small proteolytic enzyme wich lyses bacterial cell walls.
J. of Bact. 1966, 91, p. 524.

68. ERLANGER (B.F.) & GOODE (L.). - Mode of action of penicillin.
Nature 1967, 213, p. 183.

69. FELSENFELD (G.). - Fifteenth annual symposium on fundamental cancer research. Anderson Hospital and Tumor Institute University of Texas.
Press, Austin, 1962, p. 104.

70. FINHOLT (P.), JURGENSEN (G.) & KRISTIANSEN (H.). - Catalytic effect of buffers on degradation of penicillin G in aqueous solution.
J. of Pharm. sc. 1965, 54, n° 3, p. 387.

71. FINHOLT (P.), WERNER ERICHSEN (R.), HOJLUND PEDERSEN (R.). - Catalytic effect of buffers on degradation of phenoxy methyl penicillin in aqueous solution.
Medd. Norsk. farm. Selsk. 1968, 30, n° 5, p. 69.

72. FLOREY (H.W.), CHAIN (E.), HEATLEY (N.G.), JENNINGS (M.A.), SANDERS (A.G.), ABRAHAM (E.P.) & FLOREY (M.E.). - Antibiotics. Oxford Medical publication.
Oxford University Press., 1949, p. 812.

73. FOLDES (J.) & MOLNAR (J.). - A penicillin induced lytic enzyme besides penicillinase in the cells of Bacillus cereus 569.

IInd Int. Symp. Chemotherapy, Naples, 1961. IV - Chemotherapia 5, p. 31, 1962.

74. FORD (J.H.). - Hydroxylamin method of determining penicillins. 1947, 19, p. 1004.

75. FRIMPTER (G.W.). - The disulfide of L-cysteine and L-homocysteine in urine of patients of cystinuria. J. of Biol. Chem. 1961, 236, p. 51.

76. GALE (E.F.). - The nitrogen metabolism of Gram positive bacteria. Bull. Johns Hopkins Hosp., 1948, 83, p. 119.

77. GALE (E.F.) & FOLKES (J.P.). - The assimilation of amino acids by bacteria. 20 - The incorporation of labelled amino acids by discrupted staphylococcal cells. Biochem. J. 1955, 59, p. 661.

78. GALE (E.F.) & TAYLOR (E.S.). - The action of penicillin in preventing the assimilation of glutamic acid by Staphylococcus aureus. J. Gen. Microb. 1947, 1, n° 3, p. 314.

79. GALE (E.F.) & VAN HALTEREN (M.B.). - The assimilation of amino acids by bacteria. 13 - The effect of certain amino acids on the accumulation of free glutamic acid by Staphylococcus aureus : extracellular peptide formation. Biochem. J., 1951, 50, p. 34.

80. GARRETT (A.J.). - The effects of Mg ion deprivation on cell wall synthesis and accumulation of amino suggars in Bacillus subtilis. Biochem. J. 1968, 106, p. 40 P.

81. GARRETT (A.J.). - Intracellular accumulation of N-acetyl hexosamines in Micrococcus lysodeikticus. Biochem. J., 1969, 112, p. 15 P.

82. GARRETT (A.J.). - The effect of magnesium ion deprivation on the synthesis of mucopeptide and its precursors in Bacillus subtilis. Biochem. J. 1969, 115, n° 3, p. 419.

83. GHUYSEN (J.M.). - Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol. Reviews, 1968, 32, p. 425.

84. GHUYSEN (J.M.). - Structure and biosynthesis of the bacterial wall peptidoglycan. Peptides, 1968, North-Holland Publishing Comp. Amsterdam (1968), p. 283.

85. GHUYSEN (J.M.) & STROMINGER (J.L.). - Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus, strain Copenhagen. I - Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. 1963, Biochem., 2, p. 1110.

86. GOLDMAN (M.) & DAY (R.A.). - A test for penicillins on chromatograms and in spot tests. The Ohio Journ. Of Science. 1967, 67, p. 190.

87. GOODALL (R.) & DAVIES (R.). - Automatic determination of penicillin in fermentation broth.
The analyst. 1961, 86, p. 326.

88. GOUREVITCH (A.), HUNT (G.A.), PURSIANO (T.A.), CARMACK (C.C.), MOSES (A.J.) & LEIN (J.). - Microbiological evaluation of 5 methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl penicillin.
Antibiot. and Chemotherapy U.S.A. 1961, 11, n° 12, p. 780.

89. GRAFNETTEROVA (J.). - A chemical method for the determination of natural and semi synthetic penicillins in biological material.
Clin. Chim. Acta, 1965, II, p. 128.

90. GRAY (G.W.) & WILKINSON (S.G.). - The effect of E.D.T.A. on the cell walls of some Gram negative bacteria.
J. Gen. Microbiol. 1965, 39, p. 385.

91. GRENSON (M.). - Le transport des métabolites (en particulier des acides aminés) à travers les membranes cellulaires.
Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires, 1966, n° 7.

92. GRIGNARD (V.). - Hétérocycles à cinq chaînons. Groupes dits du thiazol et de l'isothiazol.
Chimie organique. Tome 2, p. 445.

93. GROS (F.) & MACHEBOEUF (M.). - Action de la pénicilline sur le métabolisme glucidique de Clostridium sporogenes (ATP).
C.R. Acad. Sci. 1947, 224, p. 858.

94. GROS (F.) & MACHEBOEUF (M.). - Réaction de Stickland : réaction d'oxydo-réduction couplée entre paire d'amino acides.
C.R. Acad. Sci. 1948, 226, p. 1318.

95. GUILLAUME (J.), MARTIN (G.) & DERIEUX (J.C.). - Etude comparée de sphéroplastes d'Escherichia coli induits au moyen de la pénicilline et du glycocolle.
Ann. Inst. Pasteur, Lille. 1958-1959, 10, p. 159.

96. HAMILTON-MILLER (J.M.T.). - Penicillinase from Klebsiella aerogenes : a comparison with penicillinases from Gram positive species.
Biochem. J. 1963, 87, n° 1, p. 209.

97. HAMILTON-MILLER (J.M.T.). - Effect of E.D.T.A. upon bacterial permeability to benzyl penicillin.
Biochem. and Biophys. Res. Com. 1965, 20, n° 6, p. 688.

98. HAMILTON-MILLER (J.M.T.), SMITH (J.T.) & KNOX (R.). - The estimation of penicillins and penicillin destruction.
J. Pharm. Pharmacol. 1963, 15, p. 81.

99. HANCOCK (R.). - Protection of Staphylococcus aureus from some effects of penicillin by media of high osmotic pressure.
Biochem. J. 1958, 70, p. 15.

100. HANCOCK (R.) & FITZ-JAMES (P.C.). - Some differences in the action of penicillin, bacitracin and vancomycin on Bacillus megaterium.
J. of Bact. 1964, 87, p. 1044.

101. HANES (C.S.), HIRD (F.J.R.) & ISHERWOOD (F.A.). -Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione.
Nature, 1950, 166, p. 288.

102. HAROLD (F.M.). - Genetic modification of passive cation permeability in Streptococcus faecalis.
Bacteriological proceedings, 1968, p. 111, P. 3.

103. HAROLD (F.M.). - Antimicrobial agents and membrane function.
Adv. Microb. Physiol. 1970, n° 4, p. 45.

104. HAROLD (F.M.), BAARDA (J.R.) & PAULOSOUA (E.). - Extrusion of sodium and H^+ ions as the primary process in potassium ions accumulation by Streptococcus faecalis.
J. Bact. 1970, 101, n° 1, p. 152.

105. HASENBANK (G.), KORBER (F.) & SIEGHUND (P.). - Uber die reaktionen von D und L penicillamin mit alanin - transaminase und mit einingen aldiminen dei pyridoxal phosphats. Z. (Hoppe - Scyler's) Physiol. Chem. Dtsch. 1968, 349, n° 3, p. 310.

106. HELE (P.). - The interaction of soluble ribonucleic acid Mg ions and sulfhydryl group in the control of amino acid dependent pyrophosphate exchange reactions.
Biochem. J. 1961, 81, p. 329.

107. HOBBY (G.L.), MEYER (R.) & CHAFFEE (E.). - Observations on the mecanism of action of penicillin.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1942, 50, p. 281.

108. HUGHES (H.), KROMER (H.) & FLEMING (A.). - The effect of penicillin on morphology.
J. Gen. Microbiol. 1946, 3, XXIII.

109. HUGO (W.B.) & RUSSEL (A.D.). - Action of 6 amino penicillanic acid on Gram bacteria.
Nature 1960, 188, p. 875.

110. HUGO (W.B.) & RUSSEL (A.D.). - Action of penicillin on Aerobacter cloacae.
J. Bact. 1961, 82, p. 411.

111. HUGO (W.B.) & RUSSEL (A.D.). - The effect of temperature on the action of penicillin on Escherichia coli.
J. Pharm. Pharmacol. 1961, 13, n° 2, p. 688.

112. HUMPHREY (B.) & VINCENT (J.M.). - Calcium in cell walls of Rhizobium trifolii
J. Gen. Microb. 1962, 29, p. 557.

113. HURWITZ (Ch.) & ROSANA (C.). - The intracellular concentration of bound and unbound Mg ions in Escherichia coli.
J. of Biol. Chem. 1967, 242, n° 16, p. 3719.

114. IDSOE (O.), GUTHE (T.), WILLCOX (R.R.) & WECK (A.L.). - Nature et importance des réactions secondaires à la pénicilline, compte tenu notamment des cas mortels par choc anaphylactique.
Rev. Biologie Médicale, 1968, n° 5, p. 402.

115. JAWETZ (E.), GUNNISON (J.B.), SPECK (R.S.) & COLEMAN (V.R.). - Studies on antibiotic synergism and antagonism. The interference of chloramphenicol with the action of penicillin.
Arch. Intern. Med. 1951, 87, p. 349.

116. JENDYKIEWICZ (Z.), RAZYNCK (S.), LUKANOWSKA (W.), STRABURZYUSKI (G.) & SZULE (S.). - En polonais : Effet de la pénicilline et de la streptomycine sur le taux de glutathion et de l'acide ascorbique dans le sang du chien.
Acta Physiol. Pol. 1963, 14, n° 3, p. 281.

117. JOCELYN (P.C.). - The standart redox potential of Cysteine-cystine from the thio disulfide exchange reaction with glutatione and lipoic acid.
European J. Biochem. 1967, 2, n° 3, p. 327.

118. KAC (L.N.), VAJNTRAUB (E.A.) & MOROZ (A.F.). - En russe : sur les changements de l'ultrastructure de Escherichia coli sous l'action des antibiotiques du groupe de la pénicilline et de l'acide 6 amino pénicillanique.
Mikrobiologika, S.S.S.R., 1968, 37, n° 2, p. 316.

119. KATO (K.) & STROMINGER (J.L.). - Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus. IX Mechanism of hydrolysis by the L_{11} enzyme.
Biochemistry 1968, 7, p. 2754.

120. KELLENBERGER (E.) & RYTER (A.). - Modern development of electron microscopy.
Academic Press New-York, 1964.

121. KENNELL (D.) & KOTOULAS (A.). - Mg starvation of aerobacter aerogenes.
I. Changes in nucleic acid composition. J. of Bact. 1967, 93, n° 1, p. 334.
MARCHEST (S.L.) & KENNELL (D.). -
II. Rats of nucleic acid synthesis and method for their measurement (ID. 1). p. 345.
III. Protein metabolism, p. 357.
KENNELL (D.) & KOTOULAS (A.). -
IV. Cytochemical changes, p. 367.

122. KING (H.K.). - The bacterial cell wall.
Biochemistry, 1961, 194, p. 299.

123. KNOX (R.). - A survey of new penicillins.
Nature 1961, 192, p. 492.

124. KNOX (R.) & COLLARD (P.). - The effect of temperature on sensitivity of Bacillus cereus to penicillin.
J. Gen. Microb. 1952, 6, p. 369.

125. KUCHINSKAS (E.J.) & ROSEN (Y.). - Metal chelates of DL penicillamin.
Arch. of Biochem. Biophys. 1962, 97, p. 370.

126. KULHANEK (M.) & TADRA (M.). - Products of acylase and β lactamase hydrolysis of some penicillins.
Folia Microb. Tchécosl. 1968, 13, n° 4, p. 340.

127. KUSHNAREV (V.M.) & SHIRNOVA (T.A.). - Electron microscopy of alkaline phosphatase of Escherichia coli.
Canad. J. Microb. 1966, 12, p. 605.

128. LAPERROUZA (C.). - La pénicillamine et la desferroxamine, nouveaux chélateurs des métaux lourds.
Médecine et Hygiène, 1964, 634, p. 269.

129. LATRILLE (J.). - Sphéroplastes et antibiose.
Thèse Doc. Sciences, 1965, Bordeaux, n° 152.

130. LEE (S.W.), FOLEY (E.J.) & EPSTEIN (J.A.). - Mode of action of Penicillin.
I. Bacterial growth and penicillin activity. Staphylococcus aureus F D A.
J. Bact. 1944, 48, p. 393.

131. LEE (S.W.), FOLEY (E.J.) & CALEY (E.R.). - "Fissibactericidal" Nature of penicillin action.
Nature, 1945, 156, p. 49.

132. LEIVE (L.). - Studies on the permeability change produced in coliform bacteria by ethylene diamine tétraacétate.
J. Biol. Chem. 1968, 243, n° 9, p. 2373.

133. LEIVE (L.) & KOLLIN (V.). - Controling EDTA treatment to produce permeable Escherichia coli with normal metabolic processes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1967, 28, n° 2, p. 229.

134. LEVADITI (C.) & HENRY (J.). - Mécanisme de l'activité antibiotique in vitro de la streptomycine sur Escherichia coli et Bacillus subtilis.
Bull. Acad. Med. 1947, 131, p. 169.

135. LEVADITI (C.) & VAISMAN (A.). - Mode d'action de la pénicilline in vitro.
C.R. Acad. Sci., 1945, 221, p. 127.

136. LHOEST (W.). - Nouveaux développements dans le domaine des pénicillines.
IL FARMACO. 1963, vol. XVIII, n° 8, p. 401.

137. LI (N.C.) & DOODY (E.). - Cu and Zn complexes of some amino acids and glycylglycine .
J. of Am. Soc. 1954, 76, n° 1, p. 221.

LI (N.C.), GAWRON (O.) & BASCUAS (G.). - Stability of Zn complexes with glutathione and oxidies glutathione.
J. of Am. Soc. 1954, 76, n° 1, p. 225.

138. LI (N.C.) & MANNING (R.A.). - Metal complexes of sulfur containing AA : some metal complexes of sulfur containing amino acid.
J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, n° 4, p. 5225.

139. LOISELEUR (J.). - Dosage du Mg plasmatique. Techniques de laboratoire : chimie clinique tome I p. 403.

140. LUSK (J.E.), WILLIAMS (R.J.P.) & KENNEDY (E.P.). - Mg and the growth of Escherichia coli.
J. Biol. Chem. U.S.A. 1968, 243, n° 10, p. 2618.

141. LYNN (B.). - Antibacterial action of the penicillins. Effect of penicillin on bacterial cell walls.
Pharm. J. 1968, 201, p. 307, p. 341.

142. MAAS (E.A.) & JOHNSON (M.J.). - Penicillin uptake by bacterial cells.
J. Bact. 1949, 57, p. 415.

143. MAAS (E.A.) & JOHNSON (M.J.). - The relations between bound penicillin and growth in Staphylococcus aureus.
J. Bact. 1949, 58, p. 361.

144. Mac CARTHY (B.J.). - The effect of Mg starvation on the ribosome content of Escherichia coli.
Biochem. Biophys. acta Scand. 1962, 55, p. 880.

145. MACHEBOEUF (M.). - Recherches biochimiques des antibiotiques : pénicilline, streptomycine, tyrothricine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, p. 1611.

146. MANDELSTAM (J.) & ROGERS (H.J.). - The incorporation of amino acids into the cell wall mucopeptide of staphylococci and the effects of antibiotics on the process.
Biochem. J. 1959, 72, p. 654.

147. MARTIN (H.H.). - Biochemistry of bacterial cell wall.
Annual Rev. Biochem. 1966, 35, p. 457.

148. MATHIES (H.) & GAEDICKE (H.). - Der einfluss von penicillamin ang den Rheumafactor im in vitro. Versuch. Klin. WSCHR. Dtsch. 1967, 45, n° 16, p. 849.

149. MEERS (J.L.) & TEMPEST (D.W.). - The influence of extracellular products on the behaviour of mixed microbial populations in magnesium limited chemostat cultures.
J. Gen. Microb. 1968, 52, n° 2, p. 309.

150. MIACQUE (J.). - La chélation. Les applications analytiques et thérapeutiques.
Produits pharmaceutiques, 1957, 12, n° 7, p. 448.

151. MICHAELS (G.B.) & EAGON (R.G.). - The effect of EDTA and of lysozyme on isolated lipopolysaccharide from "Pseudomonas aeruginosa"
Proc. Soc. Exp. Biol. 1966, 122, p. 866.

152. MILLER (W.S.), GREEN (C.A.) & KITCHEN (H.). - Biphasic action of penicillin and other sulphonamide similarity.
Nature 1945, 155, p. 210.

153. MITCHELL (P.) & MOYLE (J.). - Occurence of a phosphoric ester in certain bacteria : its relation to gram staining and penicillin sensitivity.
Nature 1950, 166, p. 218.

154. MONTGOMERIE (J.Z.), POTTER (C.S.), KALMANSON (G.M.) & GUZE (L.B.). Penicillin : Effect on sodium and potassium transport in bacterial and protoplast forms of Streptococcus faecalis.
Science 1968, 159, p. 1252.

155. MOULENE (J.). - Contribution à l'étude de l'hydrolyse des pénicillines par les entérobactéries.
Thèse de Médecine, 1967, Bordeaux, n° 125.

156. MOUSTARDIER (G.), DULONG de ROSNAY (Ch.), LATRILLE (J.) & CASTAGNOU (F.). - Antibiose et induction de sphéroplastes par les pénicillines.
Extraits des Archives de l'Institut Pasteur de Tunis. 1966, n° 1-2, p. 421.

157. NATHENSON (S.G.) & STROMINGER (J.C.). - Effects of penicillin on the biosynthesis of the cell wall of Escherichia coli and Staphylococcus aureus.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1961, 131, p. 1.

158. NEU (H.C.). - The surface localization of penicillinases in Escherichia coli and Salmonella typhi murium.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1968, 32, n° 2, p. 258.

159. NEU (H.C.), ASHMAN (D.F.) & PRICE (T.D.). - The release of the acid soluble nucleotide pool of Escherichia coli by EDTA-Tris.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1966, 25, n° 6.

160. NEU (H.C.) & CHOU (J.). - Release of surface enzymes in enterobacteriacae by osmotic shock .
J. of Bact. 1967, 94, p. 1934.

161. NICKERSON (W.J.) & VAN RIJ (N.J.W.). - The effects of sulfhydryl compounds Penicillin and Co on the cell division mechanism of yeasts.
Biochim. Biophys. acta 1949, 3, p. 461.

162. NITTI (F.), FOSSAERT (J.) & FAGUET (M.). - Recherches sur l'activité anti-staphylococcique et le mode d'action de la pénicilline.
Ann. Inst. Pasteur, 1944, 69, p. 126. 1944, 70, p. 80.

163. NOLLER (E.C.) & HARTSELL (S.E.). - Bacteriolysis of enterobacteriacae.
I Lysis by four lytic systems utilizing lysozome.
II Pre and colytic treatments potentiating the action of lysozyme.
J. Bact. 81, 1961, p. 482.

164. NOVICK (R.P.). - Micro-iodometric assay for penicillinase.
Biochem. J. 1962, 83, p. 236.

165. NOVICK (R.P.). - Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in Staphylococcus aureus.
J. Gen. Microbiol. 1963, 33, p. 121.

166. NOVICK (R.P.) & RICHMOND (M.H.). - Nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in Staphylococcus aureus.
J. of Bact. 1965, 90, n° 2, p. 467.

167. OBOJSRA (K.). - En polonais : Mécanismes du développement de l'allergie à la pénicilline.
Post. Mykrobiol. Polska, 1967, 6, n° 2, p. 241.

168. OXFORD (A.E.). - On the chemical reactions occuring between certain substances which inhibit bacterial growth and the constituents bacteriological media.
Biochem. J. 1942, 36, p. 438.

169. PAL (P.R.). - Colorimetric estimation of penicillamin.
J. Biol. Chem. 1959, 234, p. 618.

170. PARK (J.T.). - Symposium sur le mode d'action des antibiotiques.
Juillet 1952, Paris. SEDES Ed. 1952, p. 31.

171. PARK (J.T.). - Inhibition of cell wall synthesis in Staphylococcus aureus by chemicals which cause accumulation of wall precursors.
Biochem. J. 1958, 70, 2 P.

172. PARK (J.T.). - Multiple effects of penicillin. Antimicrobial agents and Chemotherapy 1963.
Edited by Sylvester J.C. Braun Brunfield. Ann. Arbor, 1964, p. 366.

173. PARK (J.T.) & STROMINGER (J.L.). - Mode of action of penicillin, biochemical basis for the mecanism of action of penicillin and for its selective toxicity.
Science 1957, 125, p. 99.

174. PASYNSKI (A.) & KATORSKAYA (T.). En russe : Du mécanisme d'action chimique et physique de la pénicilline.
Biokhimiya, 1947, 12, p. 465.

175. PENNINGTON O'GRADY (J.H.). - Reversal of the action of penicillin.
Nature 1967, 213, p. 34.

176. PEPIN (B.) & BARRAINE (R.). - La pénicillamine.
Presse médicale 1966, 74, n° 43, p. 2209.

177. PEROL (P.) & Coll. - La D pénicillamine,nouvel agent chélateur.
Semaine de l'Hôpital français. 1962, 38, p. 3337.

178. PERRET (C.J.). - Iodometric assay of penicillinase.
Nature, 1954, 174, p. 1012.

179. de PETRIS (S.). - Ultrastructure of the cell wall of Escherichia coli.
J. Ultrastructure research. 1965, 12, p. 247.

180. POLLOK (M.R.) & TORRIANI (A.M.). - Purification et caractéristiques physico chimiques de la pénicillinase de Bacillus cereus.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1953, 237, p. 276.

181. PRATT (R.) & DUFFRENOY (J.). - Cytochemicals mechanisms of penicillin action.
II - The influence of cobalt on the optimal bacteriostatic concentration of penicillin.
J. Bact. 1948, 55, p. 726.

182. PRESTIDGE (L.S.) & PARDEE (A.B.). - Induction of bacterial lysis by penicillin.
J. of Bact. 1957, 74, p. 48.

183. PRUESS (D.L.) & JOHNSON (M.J.). - Enzymatic deacylation of S-35 benzyl penicillin.
J. of Bact. 1965, 90, p. 380.

184. PULVERTAFT (R.J.V.). - Local therapy of war wounds with penicillin.
Lancet, 1943, p. 341.

185. REPASKE (R.). - Lysis of Gram negative bacteria by lysozyme.
Biochem. Biophysic. Acta, 1956, 22, p. 189.

186. REPASKE (R.). - Lysis of Gram negative organisms and the role of versene.
Biochem. Biophys. Acta Scand. 1958, 30, p. 225.

187. REYNOLDS (P.E.). - Antibiotics affecting cell wall synthesis.
"Biochem" Stud. antimicrob. Drugs 16th Symp. London 1966.
Cambridge Soc. Gen. Microb. University Press 1966, p. 47.

188. RICHMOND (M.H.). - The genetic constitution of certain penicillinase micro-mutants in Staphylococcus aureus.
J. Gen. Microbiol. 1966, 45, p. 51.

189. ROBERTS (J.) & JOHNSON (M.J.). - Effect of penicillin on the cell wall of Bacillus subtilis.
Biochem. Biophys. Acta Scand. 1962, 59, p. 458.

190. ROGERS (D.). - The mode of action of the Penicillins.
Ciba foundation study group. 1962, 13, p. 25.

191. ROGERS (D.). - Osmotic pools in Escherichia coli.
Sc. 1968, 159, p. 531.

192. ROGERS (H.J.). - Killing of Staphylococci by penicillins.
Nature, 1967, 7, p. 31.

193. ROGERS (H.J.) & JELJASZEWICA (J.). - Inhibition of the biosynthesis of cell wall mucopeptides by the penicillins.
Biochem. J. 1961, 81, p. 576.

194. ROGERS (H.J.) & MANDELSTAM (J.). - Inhibition of cell wall mucopeptide formation in Escherichia coli by benzyl penicillin and D- α amino phenyl-acetamido penicillanic acid (ampicillin).
Biochem. J. 1962, 84, p. 299.

195. RON (E.Z.), KOHLER (R.E.) & DAVIS (B.D.). - Magnesium ion dependence of free and polysomal ribosomes from Escherichia coli.
J. Molec. Biol. 1968, 36, n° 1, p. 83.

196. ROWLANDS (S.), ROWLEY (D.) & LESTER SMITH (E.). - Studies with radioactive penicillin.
J. Chem. Soc. 1949 (supp), p. 405.

197. ROWLEY (D.), COOPER (P.D.), ROBERTS (P.W.) & LESTER SMITH (E.). - The site of action of penicillin.
I - Uptake of penicillin on bacteria.
Biochem. J. 1950, 46, p. 157.

198. ROWLEY (D.), MILLER (J.), ROWLANDS (S.) & LESTER SMITH (E.). - Studies with radioactive Penicillin.
Nature, 1948, 161, p. 1009.

199. RUSSEL (A.D.). - Effect of Mg ions and EDTA acid on the activity of vancomycin against Escherichia coli and Staphylococcus aureus.
J. App. Microb. 1965, 15, n° 2, p. 395.

200. SALAS (M.), MILLER (M.J.), WAHBA (A.J.) & OCHOA (S.). - Translation of the genetic message V. Effect of Mg and formylation of methionine in protein synthesis.
Biochemistry, 1967, 57, p. 1865.

201. SALTON (M.R.J.). - Studies of the bacterial cell wall.
VIII. Monosaccharide constituents of the walls of Gram negative bacteria.
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 45, p. 364.

202. SALTON (M.R.J.). - Structure and function of bacterial cell membranes.
Ann. Rev. Microb. 1967, 21, p. 417.

203. SALTON (M.R.J.) & SHAFA (F.). - Some changes in the surface structure of Gram negative bacteria induced by penicillin action.
Nature 1958, 181, p. 1321.

204. SATO (Y.), BARRY (G.T.) & CRAIG (L.C.). - Isolation of benzylpenicillin containing radioactive sulfur.
J. Biol. Chem. 1948, 174, p. 217.

205. SAUKKONEN (J.J.). - Acid-soluble nucleotides of Staphylococcus aureus : massive accumulation of a derivative of cytidine diphosphate in the presence of penicillin.
Nature, 1961, 192, p. 816.

206. SCHEINBERG (S.H.). - D-Penicillamin with particular relation to Wilson disease.
J. Chronic. Diseases, 1964, 17, p. 293.

207. SCHEPARTZ (S.A.) & JOHNSON (M.J.). - The nature of the binding of the penicillin by bacterial cells.
J. Bact. 1956, 71, p. 84.

208. SCHERR (G.H.) & BECHTLE (R.M.). - Studies on synergists for antimicrobial agents.
Antibiotics annual. Welch & Mari-Ibanez Ed. 1958-1959, p. 855.

209. SCHNEIDER (W.). - Vergleichende untersuchungen zur wirkung von penicillamin-base und penicillamin HCl in vitro.
Z. Rheumaforsch Dtsch. 1968, 27, n° 5-6, p. 210.

210. SCHNEIDER (C.H.) & DE WECK (A.L.). - A new chemical aspect of penicillin allergy : the direct reaction of penicillin with ε amino groups.
Nature, 1965, 208, p. 57.

211. SCHULER (W.). - Die wirking von penicillin aut den staphylokokken. Gasweehsel im vergleich zur wirkung anderer antibacterieller stoffe.
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 1944, 2, p. 621.

212. SCHWARTZ (M.) & BUCHWALTER (F.). - Pharmaceutics of penicillin.
J. Pharm. Sci. 1962, 51, p.1119.

213. SCUDI (J.V.). - A colorimetric method for the determination of penicillin.
J. Biol. Chem. 1946, 164, p. 183.

214. SHOREY (J.), LOKE (J.) & POLLOCK (J.). - The cytochemical localisation of alkaline phosphatase in Escherichia coli at the electron microscopic level.
Biochem. J. 1965, 96, p. 27 c.

215. SILVER (S.) & CLARKE (D.). - Magnesium transport in Escherichia coli : Effects of high manganese concentration.
Bacterial proceedings 1970, p. 130, p. 47.

216. SINHA (R.K.) & NEUHAUS (F.C.). - Reversal of the vancomycin inhibition of peptidoglycan synthesis by cell walls.
J. of Bact. 1968, 96, p. 374.

217. SKOU (J.C.). - Studies on the Na^+ and K^+ activated ATP hydrolysing enzyme system. The role of SH groups.
Biochem. Biophys. Res. Com. 1963, 10, n° 1.

218. SMITH (J.T.) & Coll. - Preparation of the spheroplast Aerobacter cloacae.
Canad. J. Microb. 1960, 6, p. 485.

219. SMITH (D.H.) & DAVIS (B.D.). - Mode of action of novobiocin in Escherichia coli.
J. of Bact. 1967, 93, n° 1, p. 71.

220. SMITH (J.T.) & HAMILTON MILLER (J.M.T.). - Penicillinases from Gram positive and Gram negative bacteria : a thermodynamic difference.
Nature 1963, 197, p. 769.

221. SMITH (J.T.) & HAMILTON MILLER (J.M.T.). - Differences between penicillinases from Gram positive and Gram negative bacteria.
Nature, 1963, 197, p. 976.

222. SNEATH (P.H.A.) & COLLINS (J.F.). - A method for the chromatographic detection of penicillins and related compounds of penicillinase.
Biochem. J. 1961, 79, p. 512.

223. SNELL (F.D.) & SNELL (C.T.). - Colorimetric methods of analysis.
Vol. IV, p. 537, D/Van Nostrand Company New-York Ed. 1954.

224. STEWART (G.T.). - Macromolecular residues contributing to the allergenicity of penicillins and cephalosporins.
Antimicrobial agents and Chemotherapy 1967, p. 543.

225. STEWART (G.T.). - Proteinaceous and polymeric residues in β lactam antibiotics and bacitracin.
Antimicrobial agents & Chemotherapy 1968, p. 128.

226. STROMINGER (J.L.). - Microbial uridine 5' pyrophosphate N-acetylamino sugar compounds. Biology of the penicillin induced accumulation.
J. Biol. Chem. 1957, 224, p. 509.

227. STROMINGER (J.L.) and all. - Biosynthesis of the peptidoglycan of bacteria cell wall.
VII - VIII - IX - X - XI . J. Biol. Chem. 1968, 243, n° 4, p. 757.

228. STROMINGER (J.L.) & GHUYSEN (J.M.). - Mechanisms of enzymatic bacteriolysis.
Science 1967, 156, p. 213.

229. STROMINGER (J.L.) & TIPPER (D.J.). - Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mechanism of action of penicillin and other antibacterial agents.
Am. J. of Med. 1965, 39, p. 708.

230. SUIT (J.C.). - Ribonucleic acid in a "membrane" fraction of Escherichia coli and its relation to cell wall synthesis.
J. of Bact. 1962, 84, p. 1061.

231. SUZUKI (H.) & HAYASHI (Y.). - The formation of "ribosomal RNA" in Escherichia coli during recovery from Mg starvation.
Biochem. Biophys. Acta Scand. 1964, 87, p. 610.

232. SUZUKI (H.), HORI (M.) & UMEZAWA (H.). - Effect of antibiotics on Mg ion removal from Escherichia coli ribosome suspensions.
J. Antibiot. Jap. 1968, 21, n° 9, p. 571.

233. TAL (M.). - On the role of Zn^{++} and Ni^{++} in ribosome structure.
Biochim. Biophys. Acta Pays-Bas. 1968, 169, n° 2, p. 564.

234. TALACHNICK (M.), EISEN (H.) & LEVINE (B.). - A new mixted disulfide penicillamine-cysteine.
Nature 1954, 174, p. 701.

235. TANNENBAUM (N.) & NEU (H.). - Surface localisation of Escherichia coli 5' nucleotidase by electron microscopy.
J. of Bact. 1969, 100, p. 1083.

236. TEMPEST (D.W.), DICKS (J.W.) & MEERS (J.L.). - Magnesium and the growth of Bacillus subtilis.
J. Gen. Microb. 1967, 102, n° 3, 36 P.

237. TEMPEST (D.W.), HUNTER (J.R.) & SYKES (J.). - Magnesium limited growth of aerobacter aerogenes in a chemostat.
J. Gen. Microb. 1965, 39, p. 355.

238. TEMPEST (D.W.) & STRANGE (R.E.). - Variation in content and distribution of magnesium and its influence on survival in aerobacter aerogenes grown in a chemostat.
J. Gen. Microb. 1966, 44, p. 273.

239. THOMAS (R.). - Colorimetric detection of penicillins and cephalosporines on paper.
Nature 1961, 191, p. 1161.

240. TINELLI (R.). - Le glycopeptide des parois bactériennes.
Bull. Inst. Pasteur 1968, n° 12, p. 2507.

241. TIPPER (D.J.) & STROMINGER (J.L.). - Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Inhibition of cross linking.
J. Biol. Chem. 1968, 243, n° 11, p. 3169.

242. TANI (J.) & HENDLER (R.W.). - On the cytological unit for protein synthesis in vivo in Escherichia coli. Studies with spheroplasts of type K_{12} .
Biochim. Biophys. Acta. 1964, 80, p. 279.

243. TRAUT (R.R.) & HAENNI (A.L.). - The effect of sulfhydryl reagents on ribosome activity.
European J. Biochem. 1967, 2, p. 64.

244. TRUCCO (R.E.) & PARDEE (A.B.). - Synthesis of Escherichia coli cell walls in the presence of penicillin.
J. Biol. Chem. 1958, 230, p. 435.

245. TUCKER (A.N.) & WHITE (D.C.). - Release of membrane components from viable Haemophilus para influenzae by EDTA and tris (hydroxy methyl) amino methane.
J. Bact. 1970, 102, p. 498.

246. TULASNE (R.), VENDRELY (R.) & MINCK (R.). - Noyaux bactériens et pénicilline.
C.R. Soc. Biol. 1948, 142, p. 237.

247. VAITUZIS (Z.) & DOETSCH (R.N.). - Relationship between cell wall cytoplasmic membrane and bacterial mobility.
J. of Bact. 1969, 100, p. 512.

248. VIGNEAUD du (V.), KUCHINKAS (E.J.) & HORVATH (A.). - L-penicillamin and rat liver transaminase activity.
Arch. Biochem. Biophys. 1957, 69, p. 130.

249. WALSHE (J.M.). - Penicillamin : the pharmacology of a chelating agent.
Editorials 1960, 53, n° 5, p. 1090.

250. WARREN (G.H.) & GRAY (J.). - Effect of sublethal concentrations of penicillins on the lysis of bacteria by lysozyme and trypsin.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1965, 120, p. 504.

251. WARREN (G.), ROSENMAN (S.) & HORWITZ (P.). - Production of polysaccharide by Staphylococcus aureus.
IV. Correlation of lytic response with penicillin activity.
J. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1964, 117, p. 730.

252. WEBB (M.). - The effect of Mg deficiency in Gram + and Gram - bacteria.
Biochem. J. 1966, 99, n° 2, p. 24 P.

253. WEBB (M.). - The utilisation of magnesium by certain Gram positive and Gram negative bacteria.
J. Gen. Microb. 1966, vol. 43, p. 401.

254. WEBB (M.). - The influence of certain trace metals on bacteria growth and Mg utilisation.
J. Gen. Microb. 1968, 51, p. 325.

255. WEIDEL (W.), FRANK (H.) & MARTIN (H.H.). - The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli strain B. J. Gen. Microb. 1960, 22, p. 158.

256. WEINBERG (E.D.). - Enhancement of bacitracin by the metallic ions of group II B. Antibiotics annual 1958-1959.
Medical encyclopedia, Inc. New-York.

257. WEINBERG (G.), NATIVELLE (R.) & PREVOT (A.R.). - Les microbes anaerobies.
Masson Ed. Paris 1937.

258. WESTON (R.D.). - Penicilloylated protein contaminating 6-amino penicillanic acid and benzyl penicillin.
Antimicrobial agents and Chemotherapy 1967, p. 553.

259. WHITE (D.C.) & TUCKER (A.N.). - Phospholipid metabolism during change in the proportion of membrane bound respiratory fragments in Hemophilus influenzae.
J. Bact. 1969, 97, n° 1, p. 199.

260. WILKINSON (S.G.). - Cell walls of Pseudomonas species sensitive to ethylene diaminetetracetic acid.
J. of Bact. 1970, 104, n° 3, p. 1035.

261. WILSON (J.E.) & du VIGNEAUD (V.). - L-penicillamin as a metabolic antagonist.
Science 1948, 107, p. 653.

262. WISE (E.M.) & PARK (J.T.). - Penicillin : its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1965, 54, p. 75.

263. WOOD (D.) & TRISTAM (H.). - Localisation in the cell and extraction of alkaline phosphatase from Bacillus subtilis.
J. of Bact. 1970, 104, n° 3, p. 1045.

264. WYLIE (E.B.) & JOHNSON (M.J.). - Effect of penicillin on the cell wall of Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Acta Scand. 1962, 59, p. 450.

*

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE : LES NOMBREUX EFFETS DE LA PENICILLINE SUR LE METABOLISME MICROBIEN.....	7
A - Action cytochimique de la pénicilline.....	11
B - Action de la pénicilline sur les métabolismes microbiens.....	12
C - Mode d'action de la pénicilline.....	15
PREMIERE PARTIE	
PRODUCTION DE PENICILLAMINE AU COURS DE L'HYDROLYSE BACTERIENNE DES PENICILLINES	25
CHAPITRE I. : PRODUCTION DE PENICILLAMINE AU COURS DE L'INDUCTION DE SPHEROPLASTES PENICILLINE CHEZ ESCHERICHIA COLI O_{111} B_4	27
I. MATERIEL ET METHODES.	27
A - Conditions opératoires.....	27
B - Identification chromatographique de la pénicillamine,de la benzylpénicilline et de quelques dérivés.....	28
II. RESULTATS.	32
A - Production de pénicillamine	32
B - Facteurs influençant la production de pénicillamine.....	34
III. CONCLUSION	41
CHAPITRE II. : PRODUCTION DE PENICILLAMINE A PARTIR DE LA BENZYLPENICILLINE PAR DIVERSES SOUCHES MICROBIENNES	43
I. MATERIEL ET METHODES.	43
A - Les souches	43
B - Les caractéristiques des souches	44
C - Les dosages iodométriques de la benzylpénicilline et de l'acide pénicilloïque correspondant.....	45
II. RESULTATS	47
A - Production de pénicillamine par les colibacilles....	47
B - Production de pénicillamine par les salmonelles.....	51

Pages

C - Production de pénicillamine par un citrobacter et deux klebsielles..... 54

III. CONCLUSION..... 60

CHAPITRE III : PRODUCTION DE PENICILLAMINE PAR DIVERSES SOUCHES MICROBIENNES A PARTIR DE DIVERSES PENICILLINES ET DE LEURS DERIVES..... 63

I. MATERIEL ET METHODES. 63

A. Les pénicillines..... 63
B. Les acides pénicilloïques..... 67
C. Méthodes d'identification et de dosage 67

II. RESULTATS. 68

A. Les pénicillines. 68

1.Dégradation de l'ampicilline et de la synthécilline en pénicillamine 68
2.Dégradation de la méthicilline en pénicillamine... 72
3.Dégradation de l'oxacilline, la pénicilline V, l'hétacilline en pénicillamine..... 74
4.Dégradation du 6 APA en pénicillamine..... 76

B. Les acides pénicilloïques. 79

1.Dégradation de l'acide benzylpénicilloïque en pénicillamine 79
2.Dégradation de l'acide 6 amino pénicilloïque en pénicillamine 80

III. CONCLUSION. 82

CHAPITRE IV : LA PRODUCTION DE PENICILLAMINE EST-ELLE DUE A UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE ?..... 85

I. MATERIEL ET METHODES 85

A. Conditions d'induction des souches..... 85
B. Obtention des germes au repos..... 86
C. Détermination de la résistance des souches de Klebsielle au chloramphénicol..... 86

II. RESULTATS. 87

A. Production de pénicillamine après induction préalable des germes 87

1.Induction par la benzylpénicilline 87
2.Induction par l'acide benzylpénicilloïque 92
3.Induction par le 6 APA et l'acide 6-amino-pénicilloïque 94

Pages

B. La production de pénicillamine a-t-elle des optimums d'activité ?..... 94

1. Influence du pH 95
2. Influence de la température..... 99
3. Influence du chloramphénicol..... 100

III. CONCLUSION 100

CHAPITRE IV. RAPPORTS ENTRE LA DEGRADATION DE LA PENICILLINE ET LA FORMATION DE PENICILLAMINE..... 103

I. RESULTATS..... 104

A. Etude de la dégradation de 2,9 µmoles de benzylpénicilline par les Klebsielles en milieu B.P.G. hypertonique..... 104
B. Etude de la dégradation de la Pénicilline G par les souches de Klebsielles préalablement induites..... 106
C. Etude de la dégradation de la Pénicilline G par les Klebsielles en milieu B.P.G. normotonique..... 108
D. Lyse bactérienne..... 111

II. CONCLUSION..... 114

RESUME ET CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE..... 115

DEUXIEME PARTIE

ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES BACTERIES 119

CHAPITRE I. LES EFFETS DE LA PENICILLAMINE SUR LA MORPHOLOGIE DES ENTEROBACTERIES : LES SPHEROPLASTES PENICILLAMINE..... 121

OBTENIION DES PENICILLAMINES..... 122

I. MATERIEL ET METHODE..... 122

A. Contrôle et purification des pénicillamines commerciales..... 122
B. Isolement de la pénicillamine à partir d'hydrolysats acides de 6 APA..... 123
C. Isolement et purification de la pénicillamine provenant de la dégradation enzymatique de l'acide pénicilloïque..... 123

II. RESULTATS.....

A. Pénicillamine commerciale purifiée..... 124
B. Pénicillamine extraite d'hydrolysats acides de 6 APA 127
C. Pénicillamine obtenue par hydrolyse bactérienne de l'acide benzylpénicilloïque..... 128
D. Action de la pénicillamine sur les bactéries..... 129

Pages

- ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES BACTERIES..... 129

I. MATERIEL ET METHODES..... 129

A. Etude de l'action de la pénicillamine sur les germes 129
B. Etude morphologique des germes en microscopie photonique 129
C. Etude morphologique des germes en microscopie électronique..... 130

II. RESULTATS 130

A. Action inhibitrice des pénicillamines..... 131
B. Induction de formes bactériennes anormales pa la pénicillamine 132

III. CONCLUSION..... 136

CHAPITRE II : LES EFFETS DE LA PENICILLAMINE SUR QUELQUES ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES DES ENTEROBACTERIES..... 137

ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR DEUX ACTIVITES ENZYMATIQUES..... 138

I. MATERIEL ET METHODES 138

II. RESULTATS 139

A. Influence de la pénicillamine sur l'activité de la β lactamase..... 139
B. Influence de la pénicillamine sur l'activité de la β galactosidase..... 140

ACTION DE LA PENICILLAMINE SUR LES IONS Ca^{++} et MG^{++}..... 143

I. MATERIEL ET METHODES..... 143

II. RESULTATS 144

A. Propriétés chélatrices de la pénicillamine..... 144
B. Action in vitro de la pénicillamine sur les ions Ca^{++} et Mg^{++}..... 145
C. Action de la pénicillamine sur les cations divalents bactériens..... 150

III. CONCLUSION 156

CHAPITRE III : POTENTIALISATION DES PENICILLINES PAR LA PENICILLAMINE..... 157

I. MATERIEL ET METHODES..... 157

Pages

II. RESULTATS 160

A. Méthode des gradients de pénicilline en gélose..... 160
B. Méthode des papiers croisés de Chabbert 161
C. Méthode des dilutions sériées en tube : mesure des C.M.I. après 18 heures de culture 163
D. Méthodes des dilutions sériées en tube : mesure des DO de chaque tube après 18 heures de culture.. 164
E. Enregistrement de la croissance bactérienne au biophotomètre..... 172
F. Influence des ions Ca^{++} et Mg^{++} sur l'action des pénicillines et de la pénicillamine..... 177

III. CONCLUSION...... 178

RESUME ET CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE..... 181

SYNTHESE ET DISCUSSION 185

I. SYNTHESE DES RESULTATS..... 187

II. DISCUSSION 189

A. Hydrolyse des pénicillines par voie bactérienne et par voie chimique..... 190
B. Mode d'action de la pénicillamine..... 195
C. Comment la pénicillamine peut elle potentialiser l'activité antibiotique des pénicillinès..... 198

III. CONCLUSION 201

CONCLUSION GENERALE..... 203

BIBLIOGRAPHIE 207

---°---

EDITIONS BERGERET
2, rue Berneret
33 BORDEAUX

Tél. 91.12.59